

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**ANÁLISIS MOLECULAR Y MODIFICADORES
FENOTÍPICOS DE LA ENFERMEDAD DE
McARDLE.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Juan Carlos Rubio Muñoz

Bajo la dirección de los doctores

Miguel Ángel Martín Casanueva
Joaquín Arenas Barbero

Madrid, 2009

- **ISBN: 978-84-692-6755-4**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**ANÁLISIS MOLECULAR Y MODIFICADORES
FENOTÍPICOS DE LA ENFERMEDAD DE
McARDLE**

MEMORIA PARA ACCEDER AL GRADO DE DOCTOR DE:

D. JUAN CARLOS RUBIO MUÑOZ

Directores:

Dr. MIGUEL ÁNGEL MARTÍN CASANUEVA

Dr. JOAQUÍN ARENAS BARBERO

Madrid, Enero de 2009

A mi madre y a Diego

AGRADECIMIENTOS

Comenzaré por dedicar esta tesis a la memoria de mi madre, que lamentablemente no podrá disfrutar de este momento, pero como Diego dice; “seguro que puede vernos desde la estrella más brillante que aparece en el cielo por la noche”. Quería agradecerle todo el amor, el cariño, la simpatía, el apoyo y todos los sacrificios que realizó por mí en especial y por todos los que estábamos a su alrededor, porque era una persona infinitamente bondadosa.

Esta tesis también va dedicada a Diego, que aunque aún no ha cumplido los cinco años, ya tiene suficiente luz para alumbrar los momentos y espacios de oscuridad que de vez en cuando aparecen. No quiero olvidar a mi padre y a mi hermano Antonio, a los que no merezco y también quiero agradecerle a Tina, su paciencia, comprensión y apoyo continuo.

En cuanto a mis directores de tesis, me siento afortunado de haber podido compartir este trabajo con ellos. De Joaquín Arenas, me gustaría destacar su calidad humana, su cercanía, su comprensión, su preocupación y el apoyo que siempre ha dado a todos los que hemos tenido la suerte de trabajar a su lado. Es un ejemplo a seguir y siento una gran admiración por él. En cuanto a Miguel Ángel Martín, indicar que es un compañero, amigo y guía excepcional. Como recientemente he leído en algún cartel publicitario "Luke Skywalker sería otro Luke Skywalker si no hubiese existido Obi Wan Kenobi", cosa con la que estoy totalmente de acuerdo (los fans lo entenderán).

Quería agradecer a todos los componentes del grupo *LEN* del Hospital 12 de Octubre por haber formado un equipo con un ambiente estupendo de trabajo. En particular, a Inés cuya colaboración ha sido esencial para poder realizar esta tesis, y cuyo grado de implicación es tal que está empezando a manifestar la sintomatología de la enfermedad de McArdle. Y también por estar siempre ahí (en lo bueno, en lo malo, y en lo regular) al igual que Elena. A Pilar, que ha sido mi “castigo” desde el primer día que empecé a trabajar en el hospital. A Yolanda que tanto me ha enseñado y con la que he compartido tantas horas de trabajo. A Sara, por ser la sonrisa de todos los días al llegar al labo. Al Sr. B, por ser como es “metaloide y de fibra de carbono”. A Alberto García por ser un buen compañero y amigo. A Dani, con el que me he reído hasta llorar en innumerables ocasiones. A Laura M, otra sonrisa agradable que ver por las mañanas, por las tardes y por las noches y que espero que vuelva muy pronto. A Laura R, por seguirme allí donde voy a trabajar. Y a los últimos en llegar; Rosa, Henry, Cristina, M^a Carmen, Paz, Paco, Aitor, etc.... ahhh y María cuya aportación a esta tesis es infinitamente mayor que la de cualquiera de nosotros. También quería

agradecer la colaboración, la amabilidad y la ayuda inestimable de los patólogos y Neurólogos del Hospital, especialmente a la Dra. Ana Cabello, al Dr. José Ramón Ricoy y al Dr. Eduardo Gutiérrez.

Por todos los años compartidos, no podría olvidar a, Teresa, Inma y el resto de “Solisas”, a Begoña y a todos los reumatoides, a los porfíricos (Elena gracias por enseñarme el mundo del Endnote que tanto trabajo me ha ahorrado), a Miluchi, Marbella, Montse, Elena e Irene. A Pedrito, conocido como “la guía Marca de los deportes”, que por ser del Atleti me ha alegrado mucho la vida casi todos los lunes. A Julián, que siempre me ayuda con los problemas informáticos. Y al resto de gente del Centro de Investigación del Hospital Doce de Octubre y de la Fundación de Investigación.

También quería agradecer a los compañeros de la Universidad Europea de Madrid y del Hospital Vall de Hebrón de Barcelona, sin cuya aportación esta tesis hubiese sido absolutamente imposible de realizar. A Alejandro, por su ayuda, su disposición al trabajo y su preocupación continua por los pacientes, y porque “ser del Madrid da puntos”, también a Margarita con la que es un placer trabajar. Y en cuanto al grupo de Barcelona dirigido excepcionalmente por Toni quería también agradecer de manera especial la ayuda de Gisela, Elena e Israel.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	ESTRUCTURA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO	2
1.1.1	TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS	4
1.2	CONTRACCIÓN MUSCULAR.....	5
1.2.1	RUTAS METABÓLICAS	9
1.3	INTOLERANCIAS AL EJERCICIO	12
1.4	GLUCOGENOSIS.....	14
1.5	ENFERMEDAD DE McARDLE. GLUCOGENOSIS TIPO V	17
1.5.1	DEFINICIÓN	17
1.5.2	GLUCOGENO FOSFORILASA MUSCULAR (GPM)	17
1.5.3	EXPRESIÓN CLÍNICA	20
1.5.4	DIAGNÓSTICO	23
I.	Determinación de la creatina quinasa sérica (CK)	23
II.	Prueba de ejercicio en isquemia.....	24
III.	Prueba en cicloergómetro	24
IV.	Espectroscopia por resonancia magnética de fosforo MRS-P ³¹	25
V.	Biopsia muscular.....	25
1.5.5	FISIOPATOLOGÍA.....	27
1.5.6	TRANSMISIÓN GENÉTICA.....	28
I.	Gen <i>PGYM</i>	29
II.	Heterogeneidad genética	29
III.	Mutaciones en el gen <i>PYGM</i>	30
IV.	mRNA.....	31
1.5.7	TRATAMIENTO	34
I.	Tratamientos farmacológicos y nutricionales.....	35
II.	Tratamiento de las complicaciones	39
III.	Entrenamiento aeróbico.....	40
IV.	Terapia génica.....	41
1.5.8	MODULADORES FENOTÍPICOS.....	41
I.	Enzima convertidora de angiotensina (ECA).....	42
II.	α -actinina-3. Gen <i>ACTN3</i>	45
III.	Mioadenilato desaminasa. Gen <i>AMPD1</i>	46
IV.	Coactivador-1 α del receptor- γ activado por proliferadores de peroxisomas	49

1.5.9	OTRAS VARIABLES DE HETEROGENEIDAD CLÍNICA.....	51
I.	Correlación genotipo-fenotipo	51
II.	Variantes sinónimas.....	52
III.	Heterocigotos manifiestos.....	52
IV.	Estudios en mRNA	53
V.	Sexo	56
1.5.10	PRESENTACIONES ATÍPICAS	57
2.	OBJETIVOS	59
3.	RESULTADOS	61
3.1	EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y ESTRATEGIA DIAGNÓSTICA.	62
	Artículo 1	63
	Artículo 2	73
3.2	HETEROGENEIDAD CLÍNICA. VARIABLES MODIFICADORAS DEL FENOTIPO CLÍNICO.....	77
	Artículo 3	78
	Artículo 4	85
3.3	ESTUDIOS DE EXPRESIÓN EN EL GEN <i>PYGM</i>	91
	Artículo 5	92
4.	DISCUSIÓN	100
4.1	HETEROGENEIDAD Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR.....	101
4.2	ESTRATEGIA DIAGNÓSTICA	105
4.3	CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO	106
4.4	GENES Y OTROS ASPECTOS MODIFICADORES DEL FENOTIPO	108
4.5	ESTUDIOS DE EXPRESIÓN EN EL GEN <i>PYGM</i>	115
5.	CONCLUSIONES	119
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	122

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Tipos de Glucogenosis</i>	<i>16</i>
<i>Tabla 2. Escala de Gravedad Clínica de los pacientes</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 3. Mutaciones en el gen PYGM.....</i>	<i>31</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Fibra muscular.....</i>	<i>3</i>
<i>Figura 2. Organización de la fibra muscular.</i>	<i>3</i>
<i>Figura 3. Detalle de fibra muscular tipo I y tipo II.</i>	<i>5</i>
<i>Figura 4. Modelo del filamento deslizante</i>	<i>6</i>
<i>Figura 5. Rutas metabólicas involucradas en la obtención de energía durante el ejercicio físico.</i>	<i>12</i>
<i>Figura 6. Rutas metabólicas implicadas en la contracción muscular.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 7. Representación de las glucogenosis.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 8. Mecanismo de activación de la degradación de glucógeno.</i>	<i>19</i>
<i>Figura 9. Estructura del enzima GPM “b”.</i>	<i>20</i>
<i>Figura 10. Microscopio óptico: Músculo estriado de un paciente con Enfermedad de McArdle: Tinción PAS, muestra acumulo de glucógeno.</i>	<i>26</i>
<i>Figura 11. Microscopio óptico: Tinción de fosforilasa.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 12. Sistema Renina-Angiotensina.</i>	<i>43</i>
<i>Figura 13. Acoplamiento entre las reacciones catalizadas por adenilato quinasa y AMP desaminasa.</i>	<i>47</i>
<i>Figura 14. Ciclo de los nucleótidos de purina.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 15. Mecanismo de degradación mediada por proteínas terminadoras.....</i>	<i>55</i>

ABREVIATURAS

ACE: Gen de la enzima convertidor de angiotensina	IMP: Inosín monofosfato
ACNT3: Gen de la α -actinina-3	MADA: Mioadenilato desaminasa
AK: Adenilato quinasa	MPL: Miofosforilasa
ADP: Adenosín difosfato	MRS-P ³¹ : Espectroscopia por resonancia magnética de fosforo
AGL: Ácidos grasos libres	NAD ⁺ : Nicotinamida adenina dinucleótido
AK: Adenilato quinasa	NADP ⁺ : Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
AMP: Adenosín monofosfato	NMD: Nonsense mediated decay
AMPC: AMP cíclico	PAS: Tinción Acido peryódico de Schiff
AMPD1: Gen mioadenilato desaminasa	Pb: Pares de bases
ATP: Adenosín trifosfato	PCR-RFLP: Reacción en cadena de polimerasa y Polimorfismos del tamaño de los fragmentos de restricción
cDNA: DNA complementario	PK: Fosforilasa quinasa
CK: Creatín quinasa	PLP: Piridoxal fosfato
Cr: Creatina	PTC: Codón prematuro de terminación.
CPT: Carnitina palmitoil transferasa	PYGM: Gen miofosforilasa
Da: Daltons	RMN-P ³¹ : Resonancia magnética de fosforo
DNA: Acido desoxirribonucleico	RNA: Acido ribonucleico
ECA: Enzima convertidora de angiotensina	SRA: Sistema renina angiotensina
ESEs: Exonic splicing enhancer	VLCAD: déficit de deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena muy larga
ESSs: Exonic splicing silencer	VO _{2max} : Consumo máximo de oxígeno
FC: Fosfocreatina	VO _{2pico} : Consumo de oxígeno pico
GLUT4: Transportador de glucosa dependiente de insulina	VT: Umbral ventilatorio
GPB: Glucógeno fosforilasa cerebral	
GPL: Glucógeno fosforilasa hepática	
GPM: Glucógeno fosforilasa muscular	
GSD: Glucogenosis	
GTP: Guanosín trifosfato	
IE: Intolerancia al ejercicio	
Kb: Kilo base	

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ESTRUCTURA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

Todos los sistemas biológicos responsables de producir movimiento utilizan la energía liberada en la hidrólisis de enlaces fosfato “de alto nivel energético” contenidos en el adenosín trifosfato (ATP). El movimiento corporal se produce como consecuencia de la contracción muscular, lo que requiere un aporte continuo de energía. Las principales proteínas musculares son *actina* y *miosina*, que también se encuentran en otros tipos celulares, participando en diferentes tipos de movimientos celulares e intracelulares. En el tejido muscular, los filamentos de actina y miosina interactúan entre sí para generar el fenómeno de contracción. En función de su morfología existen tres tipos de músculos diferentes (Mathews, et al., 2004):

- El *músculo liso*, constituye el componente contráctil de los órganos internos como los vasos sanguíneos, vesícula biliar y el intestino, también se encuentra en la piel, el aparato reproductor y el excretor. Se relaciona con contracciones lentas y sostenidas de tipo involuntario.
- El *músculo cardíaco*, se puede considerar una forma especializada del músculo estriado, siendo responsable de las contracciones involuntarias y repetidas del corazón.
- El *músculo estriado*, se encarga del movimiento voluntario. Está constituido por miles de células cilíndricas, alargadas (1-40 mm) y multinucleadas, llamadas fibras musculares, que se disponen en paralelo unas a otras y se unen mediante tejido conjuntivo. Se agrupan formando fascículos que son haces alargados, denominándose sarcolema a la membrana celular de las mismas.

Las fibras musculares (figura 1) presentan un grosor que oscila entre 10 y 80 micras de diámetro. Cada una de ellas está formada por centenares o millares de miofibrillas, con una longitud de 1 a 2 micrómetros. Las miofibrillas constan a su vez de múltiples filamentos, que son unas hebras delgadas o gruesas formadas por polímeros proteicos de actina (filamentos finos) y miosina (filamentos gruesos) (Guyton and John, 2006).

Bajo el microscopio electrónico las fibras musculares presentan una mezcla alternante de bandas claras llamadas bandas I (isótropa) y bandas oscuras llamadas bandas A (anisótropa). A su vez la banda I es intersectada por una línea más oscura llamada

línea Z (de Zwichenscheibe), y en la banda A se pueden apreciar las líneas M (de Mittellmembram, intersecta la banda A) y H (de Hell, separa la línea A de la M) (figura 2).

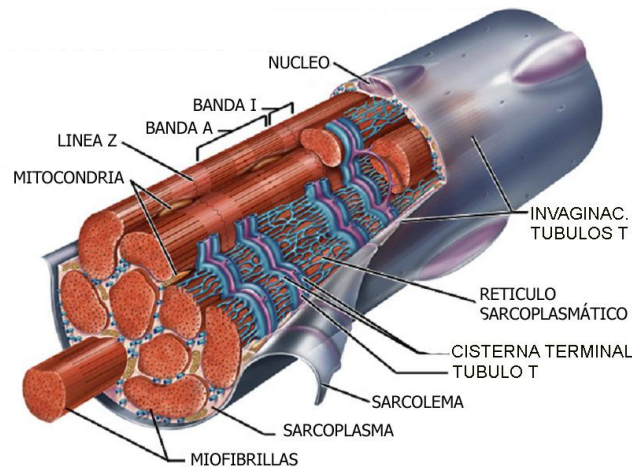


Figura 1. Fibra muscular.

Imagen obtenida de <http://magisnef.files.wordpress.com>

Toda esta estructura es la organización del sarcómero, o unidad funcional básica del tejido muscular. El sarcómero, es la porción comprendida entre dos líneas Z, cuando la fibra está en reposo mide aproximadamente unas 2 micras (Mathews, et al., 2004).

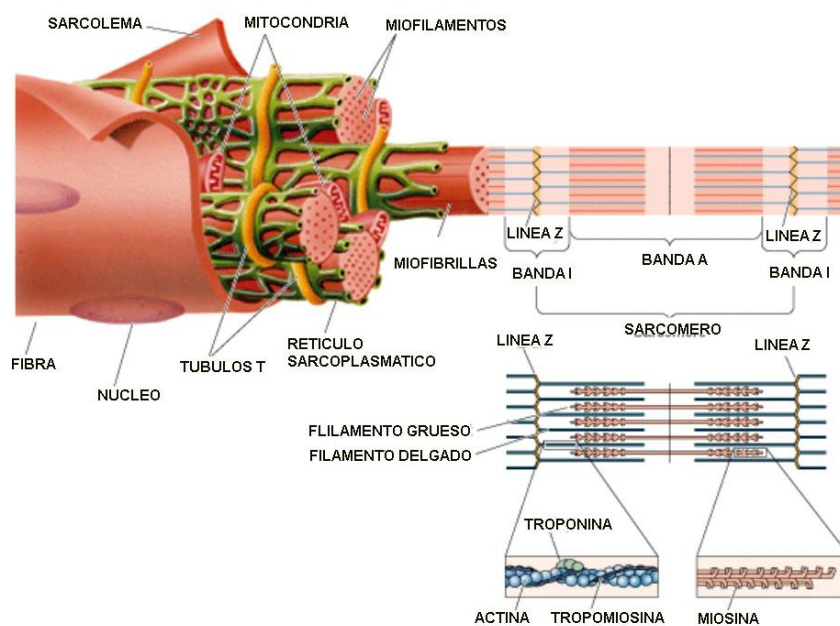


Figura 2. Organización de la fibra muscular.

Imagen obtenida de <http://magisnef.files.wordpress.com>

Cuando la fibra se estira, los filamentos de actina se separan. Durante la contracción, disminuye la longitud de cada sarcómero, las líneas Z consecutivas se aproximan, y los filamentos de actina se acercan por sus extremos hasta superponerse. Los filamentos no modifican su longitud al deslizarse unos sobre los otros, manteniéndose constante la anchura de la banda A durante la contracción. Las miofibrillas se encuentran rodeadas de fluido intracelular llamado sarcoplasma, que contiene ATP, fosfato, magnesio, enzimas, proteínas, mioglobina, lípidos, y minerales.

1.1.1 TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS

Se pueden diferenciar en fibras musculares *tipo I*, denominadas también rojas, oscuras, aeróbicas o de *contracción lenta* y fibras musculares *tipo II*, llamadas también blancas, claras o de *contracción rápida* (Levy, et al., 2006).

Fibras tipo I. Se caracterizan por presentar un número reducido de miofibrillas, lo que hace que sean fibras de contracción lenta. La abundancia de mitocondrias y de mioglobina, las confiere por un lado gran capacidad de almacenamiento de oxígeno y por otro un metabolismo fundamentalmente oxidativo o aeróbico. Son resistentes a la fatiga, ya que poseen abundante reserva energética (glucosa y oxígeno del torrente sanguíneo).

Fibras tipo II. Estas fibras de contracción rápida se caracterizan por la abundancia de miofibrillas que ocupan la casi totalidad del sarcoplasma. La cantidad de mioglobina y mitocondrias en el sarcoplasma es pequeña. Son capaces de almacenar grandes cantidades de glucógeno. Existen dos subtipos en función de su metabolismo:

- las fibras II-A, tienen un metabolismo intermedio entre las oxidativas (Tipo I) y las glucolíticas (Tipo II-B). Son fibras oxidativas rápidas que obtienen la energía tanto de la vía aerobia como de la vía anaerobia mediante glucólisis. Son resistentes a la fatiga pero no tanto como las fibras tipo I
- las fibras II-B o rápidamente fatigables. Son fibras de contracción más rápida en las que solo existe el metabolismo glucolítico o anaeróbico. La cantidad de energía que producen es baja, sus reservas escasas y la producción de sustancias residuales es alta.

El músculo presenta ambos tipos de fibras predominando un tipo u otro dependiendo del tipo de ejercicio que se realice.

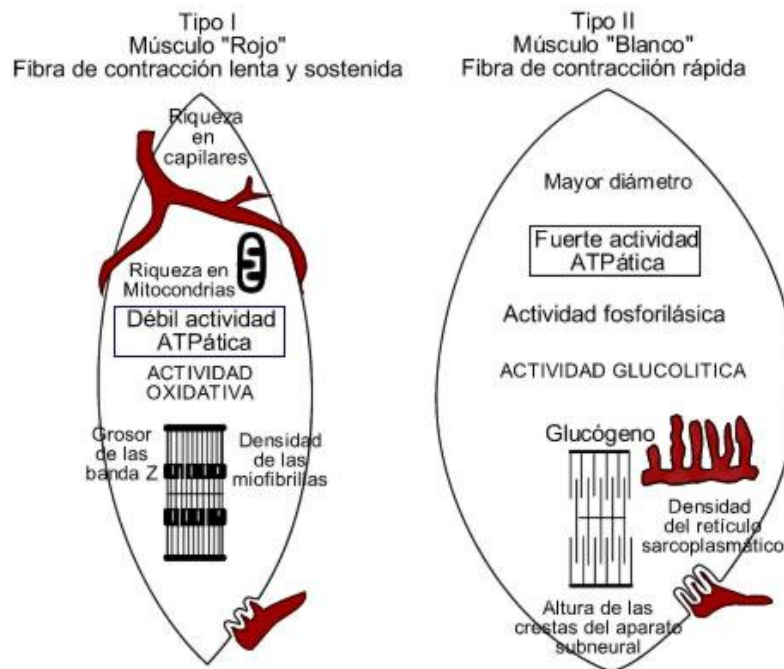


Figura 3. Detalle de fibra muscular tipo I y tipo II.

Imagen obtenida de <http://masfuertequeelhierro.blogspot.com>

1.2 CONTRACCIÓN MUSCULAR

Las principales proteínas del músculo son la actina y la miosina. Los filamentos gruesos contienen miosina, mientras que los filamentos finos contienen actina, tropomiosina y troponina. La hidrólisis del ATP unido a la miosina genera el deslizamiento de unos filamentos sobre otros.

La *miosina* es la proteína más abundante del músculo esquelético, siendo el mayor constituyente de los filamentos gruesos. Consta de 6 cadenas polipeptídicas (dos pesadas y cuatro ligeras). Las cadenas pesadas poseen largas "colas" de α -hélices entrelazadas en una especie de vástago de doble hebra y unas regiones de "cabeza" globulares a las que se unen las cadenas ligeras, ambas partes se separan mediante un tallo flexible. La región globular de la miosina presenta actividad ATPasa, que hidroliza el ATP generando la energía necesaria para la contracción muscular (Mathews, et al., 2004). Las cabezas y parte del vástago forman puentes cruzados que

interaccionan con la actina para generar la fuerza contráctil. El resto de la molécula de miosina forma el esqueleto del filamento grueso.

La *actina* es un polímero helicoidal alargado (actina F) de un monómero globular (actina G), es el mayor constituyente de los filamentos delgados y tiene lugares de unión para la miosina en cada subunidad (Mathews, et al., 2004). La unión e hidrólisis del ATP dirige la formación y disociación cíclica de complejos entre los puentes cruzados de miosina de los filamentos gruesos y las unidades de actina de los filamentos delgados, acortando con ello la distancia entre las líneas Z. La energía necesaria para la contracción muscular proviene de cambios conformacionales que tienen lugar en las cabezas, al modificarse su afinidad por la actina. Las bisagras entre los diferentes dominios de la miosina permiten a las cabezas unirse y liberarse reversiblemente de la actina y cambiar su orientación cuando están unidas.

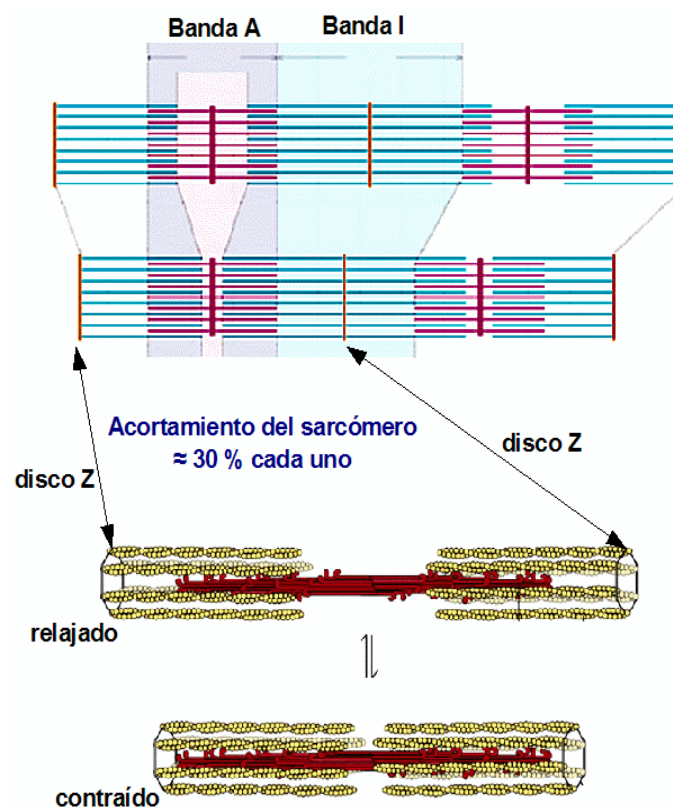


Figura 4. Modelo del filamento deslizante

Imagen obtenida de <http://www.personales.ulpgc.es/ecastro.dbbf/Transparencias/musculo01/musculo2004.html>

En los filamentos finos hay otras cuatro proteínas con una función esencial en la contracción de los mismos. La *tropomiosina*, una proteína fibrosa en forma de bastón

asociada a los filamentos de actina, que se encuentra en forma de dímeros y unida no covalentemente a las cadenas F de actina. Las otras tres son proteínas de bajo peso molecular, denominadas *troponinas I, C y T*, que se hayan unidas a los filamentos de actina.

El *modelo de filamentos deslizantes*, que describe el proceso de contracción muscular fue descrito en los años cincuenta por dos investigadores independientes, Hugh Huxley y Andrew Huxley (Huxley and Niedergerke, 1954; Huxley and Hanson, 1954). Según este modelo los filamentos de miosina se deslizan sobre los filamentos de actina interdigitados, traccionando de ellos y produciendo por tanto el acortamiento del sarcómero, sin que se altere la longitud de los filamentos (Mathews, et al., 2004). Durante este proceso desaparecen casi completamente las bandas I, y las zonas H, y las líneas Z se desplazan contra las bandas A, los filamentos de actina ocupan la banda A y la H.

El comienzo de la contracción muscular consta de una serie de etapas sucesivas (Guyton and John, 2006):

1. Un potencial de acción viaja por un nervio motor hasta el final del mismo en las fibras musculares.
2. En cada extremo, el nervio secreta una pequeña cantidad de acetilcolina.
3. La acetilcolina actúa localmente, abriendo canales para iones sodio. La entrada del sodio a la fibra muscular hace que comience un potencial de acción.
4. Este potencial se desplaza a lo largo de la membrana de la fibra muscular, se despolariza la membrana y viaja hacia su interior.
5. Se liberan grandes cantidades de calcio, desde el retículo endoplásmico hacia las miofibrillas.
6. Los iones calcio inician fuerzas de atracción entre los distintos filamentos de actina y miosina, haciendo que se deslicen conjuntamente; siendo éste el proceso de contracción.
7. A continuación se bombean los iones calcio hacia el retículo sarcoplásmico, donde quedaran almacenados hasta que llegue un nuevo potencial de acción.

Para que la contracción muscular se produzca se requiere un gasto energético, la molécula que actúa como intermediaria en este proceso es el ATP. La hidrólisis del ATP produce adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi) y producción de energía (Richards, et al., 2002). Las reservas de ATP en las células musculares son

limitadas, por lo que cuando como consecuencia del ejercicio físico, aumenta su demanda, se produce un incremento de su síntesis a partir de ADP (DiMauro, 1995). En el mecanismo de la contracción muscular la región globular de la miosina participa en un ciclo repetitivo de creación y ruptura de puentes cruzados con un filamento fino. El proceso consta de una serie de etapas (Guyton and John, 2006):

1. Antes del comienzo de la contracción, las cabezas de los puentes cruzados se unen con ATP. La actividad ATPasa de la cabeza de miosina hidroliza el ATP, obteniéndose ADP y Pi que quedan unidos a la cabeza. La cabeza se dispone perpendicularmente hacia el filamento de actina sin llegar a tocarlo.
2. Los iones calcio anulan el efecto inhibitor del complejo troponina-tropomiosina, quedando disponibles los sitios activos de actina, uniéndose entonces a las cabezas de miosina.
3. La unión entre la cabeza del puente cruzado y el sitio activo del filamento de actina produce un desplazamiento de la cabeza, dirigiéndose esta hacia atrás, hacia el brazo del puente cruzado. Esto provoca el impulso de fuerza para tirar del filamento de actina.
4. Al inclinarse la cabeza del puente cruzado, se libera el ADP y el Pi, uniéndose una nueva molécula de ATP al sitio donde estaba unido el ADP. Desprendiéndose la cabeza de la actina.
5. La molécula de ATP se desdobla y la energía liberada endereza la cabeza que recupera su posición perpendicular y queda lista para comenzar un nuevo impulso de fuerza.
6. Cuando la cabeza se endereza, se une a un nuevo sitio activo del filamento de actina, se desendereza y se genera un nuevo impulso de fuerza, y así sucesivamente.

La presencia de tropomiosina y de las troponinas inhibe la unión de las cabezas de miosina a la actina, hasta que la concentración de calcio sea del orden de 10^{-5} M. La unión del calcio a la troponina C, produce un reordenamiento del complejo troponina-tropomiosina, lo que hace que estén disponibles los sitios de unión de actina para las cabezas de miosina (Mathews, et al., 2004).

El calcio juega un papel esencial en la contracción muscular. La estimulación neuronal de la fibra muscular conlleva la liberación del calcio almacenado en el retículo sarcoplásmico hacia el citoplasma, difundiendo a las fibras musculares donde se une a la troponina.

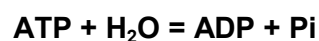
1.2.1 RUTAS METABÓLICAS

Para mantener los procesos de contracción y relajación muscular el músculo requiere ATP como fuente principal de energía. El ATP se obtiene a partir de diferentes rutas metabólicas y sustratos. Esto dependerá de la duración y del tipo de ejercicio que se vaya a realizar. Los sistemas energéticos a partir de los cuales se produce la resíntesis del ATP son los siguientes (Layzer, 1991) (Figura 5):

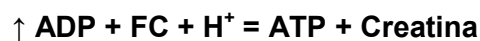
I. Sistema anaeróbico aláctico. Metabolismo de los fosfágenos.

En esta ruta no se requiere oxígeno y no se genera ácido láctico. Durante el proceso, se produce un flujo muy grande en la producción de energía, ya que la velocidad de resíntesis del ATP a partir de la fosfocreatina (FC) es muy elevada. Debido a este hecho la cantidad de energía formada por unidad de tiempo es muy grande y por el contrario la cantidad total de energía producida es muy pequeña, por lo que se agota rápidamente. Cuando los depósitos de fosfocreatina (FC) se agotan el proceso no puede tener lugar, es decir, la actividad muscular se puede mantener únicamente durante unos pocos segundos. Esta vía permite realizar esfuerzos de muy corta duración y máxima intensidad.

Los sustratos más importantes son el ATP y la fosfocreatina. La enzima ATPasa situada en las cabezas de miosina, hidroliza las moléculas de ATP, para producir el desplazamiento de la actina y generar la contracción muscular.



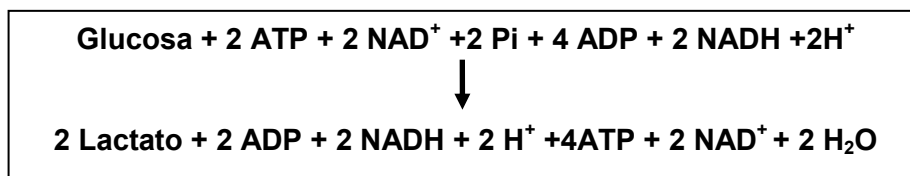
La fosfocreatina permite la resíntesis rápida de ATP a partir de su reserva muscular. La reacción es catalizada por la enzima creatina quinasa (CK), la cual se activa al aumentar la concentración de ADP.



II. Glucólisis anaerobia o sistema anaeróbico láctico.

Es la primera etapa de la respiración celular y se produce en el citosol. Supone la metabolización de glucosa celular en ausencia de oxígeno. En este sistema además del ATP se generan dos moléculas de ácido láctico. La velocidad de esta ruta metabólica no es tan elevada como en la vía aláctica, ya que la cantidad de energía producida por unidad de tiempo es menor. El tipo de ejercicio que se puede realizar será por tanto de menor intensidad en comparación con el metabolismo anaeróbico aláctico.

La glucosa utilizada por el músculo, proviene del glucógeno almacenado en el hígado y de las reservas de glucógeno muscular. Mediante esta ruta se sintetizan dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, lo que proporciona la energía suficiente para realizar ejercicio físico entre 1 y 3 minutos aproximadamente. El transportador de membrana GLUT4 se encarga de que glucosa llegue al interior de la célula del tejido muscular. La ruta consta de un conjunto de reacciones mediante las cuales se convierte glucosa en piruvato, generándose 2 moléculas de ATP en el proceso.



El aumento de la producción de lactato e hidrogeniones conlleva una disminución del pH celular inhibiéndose la actividad enzimática. En presencia de niveles de oxígeno suficientes el lactato es convertido en piruvato que es oxidado para producir CO₂ y H₂O.

III. Fosforilación oxidativa mitocondrial (vía metabólica aeróbico-oxidativa).

Esta ruta metabólica utiliza como sustratos oxidables al glucógeno almacenado en el músculo, la glucosa del torrente sanguíneo y los ácidos grasos libres (AGL) del plasma. El ATP se sintetiza a partir del glucógeno almacenado en el músculo a través de la glucólisis y la glucosa sanguínea. En presencia de oxígeno la glucosa se transforma en ácido pirúvico que tras su oxidación total, vía ciclo de Krebs, en la cadena respiratoria mitocondrial se convierte en dióxido de carbono, agua y 38

moléculas de ATP, que se utilizarán para la actividad contráctil o para reponer los depósitos de fosfocreatina.

IV. Reacción de la adenilato quinasa (AK)

La adenilato quinasa convierte dos moléculas de ADP en una molécula de ATP y una molécula de adenosín monofosfato (AMP). Esta reacción se encuentra acoplada a la catalizada por la mioadenilato desaminasa (MADA), que convierte el AMP formado en inosín monofosfato (IMP) (Arenas and Martin, 2003).

La ruta metabólica implicada en la obtención de energía, dependerá del tipo, duración e intensidad del ejercicio. Así, cuando el músculo está en reposo utiliza casi de manera exclusiva los AGL, representando un 70% de los requerimientos energéticos en esta fase, por el contrario cuando el ejercicio es extremadamente intenso, cercano al consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}), la energía se obtiene principalmente del glucógeno almacenado, mediante la glucólisis anaerobia (Arenas and Martin, 2003). En situaciones intermedias, durante el ejercicio submáximo, el sustrato utilizado depende de la intensidad relativa del ejercicio. Si la intensidad del ejercicio es inferior al 50% de VO_{2max} el músculo utiliza sobre todo los AGL, mientras que a intensidades mayores aumenta la proporción de energía procedente de la oxidación de los carbohidratos y el glucógeno se convierte en un combustible esencial. Para niveles de esfuerzo en torno al 70-80% de VO_{2max} el glucógeno es la vía principal de obtención de energía, a través de la glucólisis aeróbica; así cuando los depósitos de éste se agotan comienza a aparecer la fatiga. (Arenas and Martin, 2003; Di Mauro, 2007).

El ejercicio intenso y prolongado, provoca que disminuyan los depósitos de glucógeno muscular, de forma que se consume más ATP del que se produce, apareciendo la fatiga muscular que exige un periodo de menor carga de trabajo para restaurar la función contráctil normal. También provocan fatiga muscular la acumulación de determinados metabolitos producidos por vía anaeróbica como fosfato inorgánico e hidrogeniones (Westerblad, et al., 2002). Después de un ejercicio extenuante no sólo aparece fatiga, sino que siguen consumiéndose altas cantidades adicionales de oxígeno, que se utilizan para renovar las reservas musculares de oxígeno (unido a la mioglobina) y los depósitos de glucógeno, fosfocreatina y ATP, así como para convertir el lactato en piruvato y posteriormente, en glucosa o en glucógeno.

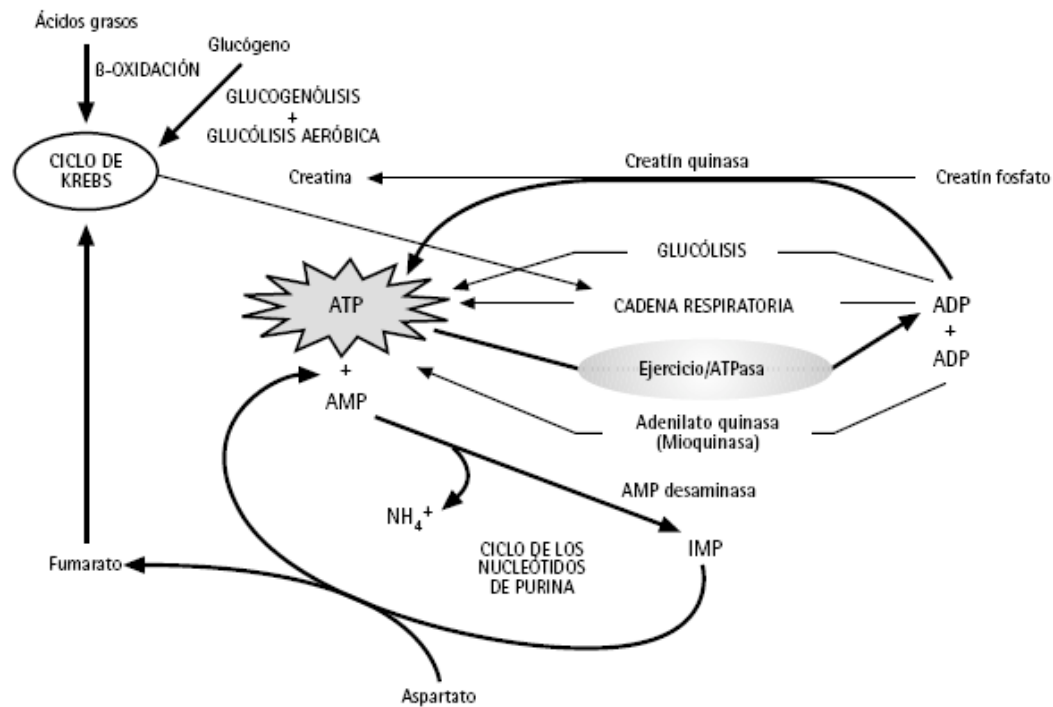


Figura 5. Rutas metabólicas involucradas en la obtención de energía durante el ejercicio físico.

Imagen obtenida de Arenas J, Martín MA. *Neurología* 2003; 18: 291-302

1.3 INTOLERANCIAS AL EJERCICIO

La intolerancia al ejercicio (IE), es el síntoma principal de las miopatías metabólicas, y supone la dificultad para realizar determinados tipos de ejercicio, apareciendo el cansancio fácilmente. En muchas ocasiones existen dificultades para establecer el diagnóstico etiológico.

El grado de IE es variable entre los distintos tipos de miopatías. La mayoría de los pacientes con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos presentan crisis agudas y transitorias de fatigabilidad temprana, contracturas y rabdomiolisis, pero en los enfermos de McArdle tras la aparición de los primeros síntomas y un periodo variable de 5-10 minutos, pueden experimentar una mejoría por la mayor disponibilidad de glucosa sanguínea para los músculos, fenómeno conocido como “segundo aliento” (del inglés *second wind*) (Haller and Vissing, 2002). En cambio en otros defectos metabólicos la fatiga aparece sólo después de haber realizado ejercicio prolongado de larga duración.

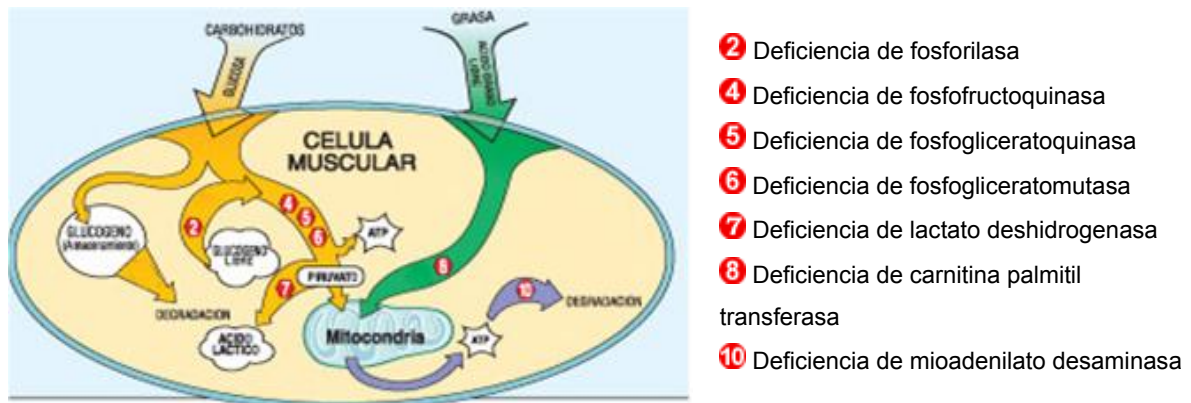


Figura 6. Rutas metabólicas implicadas en la contracción muscular.

Imagen obtenida de <http://www.mda.org/espanol/esp-fa-metab-qa.html>

Se conocen un grupo de enzimopatías relacionadas con alteraciones en las rutas metabólicas implicadas en la obtención de energía para la realizar la contracción muscular que cursan con IE (Figura 6):

- Glucogenosis musculares: Déficit de miofosforilasa (MPL) (DiMauro, 1995; McArdle, 1951), déficit de fosfofructoquinasa (PFK) muscular (DiMauro, 1995; Tarui, et al., 1965) y deficiencias enzimáticas de la glucólisis distal (déficit de fosfogliceratoquinasa, fosfogliceratomutasa y lactato deshidrogenasa, déficit de enolasa) (DiMauro, 1995).
- Alteración del transporte mitocondrial de ácidos grasos de cadena larga: forma adulta del déficit de carnitina palmitoil transferasa (CPT) II (DiMauro and DiMauro, 1973), y forma miopática del déficit de deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCAD) (Tein, 1996).
- Alteración del ciclo de los nucleótidos de purina: Déficit de mioadenilato desaminasa (AMPD1;MADA) (Fishbein, et al., 1978).
- Alteración en los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial asociados a IE como síntoma prominente (Gamez, et al., 1999).

Aunque el bloqueo en la producción de ATP se ha considerado como el primer factor implicado en la IE, existe controversia en cuanto a la existencia o no de depleción de los niveles de ATP. En este sentido, se ha descrito que no existe disminución de los niveles de ATP durante el ejercicio en pacientes con déficit de miofosforilasa

(Edwards, et al., 1982). Por el contrario, un estudio realizado en 19 pacientes con este trastorno indicó que la depleción de los niveles de ATP después del ejercicio isquémico se correlaciona con un aumento de la degradación de fosfocreatina. Este hecho junto con la captación del ATP generado en la glucólisis por las funciones Na^+ , K^+ , y Ca^{++} ATPasas que conducirían a una alteración en los niveles intra y extracelulares de Na^+ , K^+ , y Ca^{++} , podría explicar la alteración en la contractilidad muscular (Zange, et al., 2003).

1.4 GLUCOGENOSIS

Se conocen quince tipos de glucogenosis (tabla 1), siendo el hígado y el músculo los tejidos más afectados posiblemente debido a que son los que acumulan mayor cantidad de glucógeno (DiMauro, 1995). De todas las glucogenosis (figura 7), la mayoría conllevan afectación muscular de forma aislada o bien con participación de otros tejidos, y son causadas por defectos enzimáticos implicados en la degradación del glucógeno. Estos trastornos son hereditarios siendo su transmisión autosómica recesiva o ligada al cromosoma X (tabla 1). Existen algunas discrepancias en la literatura en relación a la nomenclatura de algunas glucogenosis (DiMauro, 1995; Vorgerd and Zange, 2002).

Las glucogenosis que afectan al músculo esquelético presentan dos fenotipos: *i*) IE (crisis agudas de calambres, rabdomiolisis, y mioglobinuria asociada al ejercicio intenso o moderado) y, *ii*) debilidad muscular permanente que puede ser progresiva, pudiendo ésta depender o no de la cantidad de glucógeno almacenado (Vorgerd and Zange, 2002). Las complicaciones aparecen tras realizar ejercicio moderado/intenso ($>50\% \text{VO}_{2\text{max}}$) o prolongado, y también durante periodos de inactividad o muy baja actividad. La más frecuente de las enfermedades que se asocian al síndrome de IE es la enfermedad de McArdle (Arenas and Martin, 2003). En conjunto, la prevalencia de las glucogenosis es de 1 caso por cada 20.000-43.000 nacimientos (Ozen, 2007).

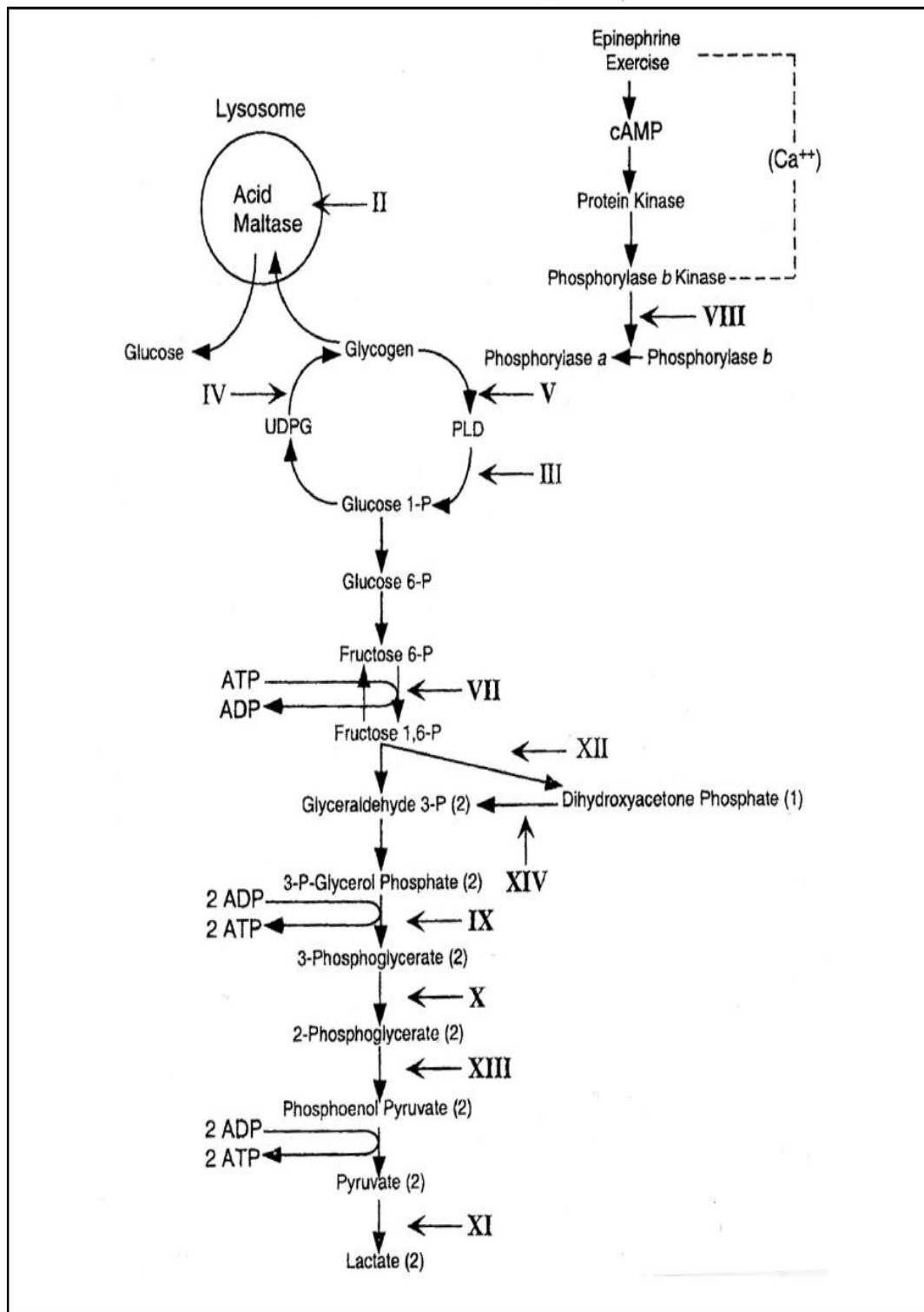


Figura 7. Representación de las glucogenosis.

II, Maltasa ácida o α -Glucosidasa lisosomal; III, Enzima desramificante; IV, Enzima ramificante; V, Glucógeno fosforilasa; VII, Fosfofructoquinasa; VIII, Fosforilasa b quinasa; IX, Fosfoglicerato quinasa; X, Fosfoglicerato mutasa; XI, Lactato deshidrogenasa; XII, Aldolasa; XIII, Enolasa; XIV, Triosafofato Isomerasa.

Imagen obtenida de (DiMauro, 1995)

Tabla 1. Tipos de Glucogenosis

Tipo	Nombre o Déficit	Defecto enzimático	Tejido afecto	Herencia
0	Glucógeno Sintasa Hepática	Glucógeno Sintasa	Hígado	AR
Ia	Von Gierke	Glucosa-6-fosfatasa	Hígado, riñón, intestino	AR
Ib	Transportador de la Glucosa-6-fosfatasa	Transportador T1 de la Glucosa-6-fosfatasa	Hígado	AR
IIa	Pompe	α -Glucosidasa lisosomal	Músculo, SNC, hígado, corazón	AR
IIb	Danon	proteína lisosómica LAMP2	Músculo cardíaco y esquelético	X
III	Cori Forbes	Enzima desramificante	Hígado, corazón	AR
IV	Andersen	Enzima ramificante	Hígado, corazón, cerebro	AR
V	McArdle	Glucógeno fosforilasa muscular	Músculo	AR
VI	Hers	Glucógeno fosforilasa hepática	Hígado	AR
VII	Tarui	Fosfofructoquinasa muscular	Músculo, eritrocitos	AR
VIII	Glucogenosis hepática tipo I	Fosforilasa quinasa hepática	Hígado, eritrocitos, leucocitos	X
VIII	Glucogenosis hepática y muscular	Subunidad β Fosforilasa quinasa	Hígado, músculo, leucocitos, eritrocitos	AR
IX	Fosfoglicerato quinasa	Fosfoglicerato quinasa	Músculo, eritrocitos, SNC	X
X	Fosfoglicerato mutasa	Fosfoglicerato mutasa	Músculo	AR
XI	Lactato Deshidrogenasa	Lactato deshidrogenasa	Músculo	AR
XII	Aldolasa A	Aldolasa A	Músculo, eritrocitos	AR
XIII	β -Enolasa	β -Enolasa	Músculo	AR
XIV	Triosafofato isomerasa	Triosafofato isomerasa	Músculo, eritrocitos, SNC	AR

Abreviaturas: AR, Herencia Autosómica recesiva; X, Herencia ligada al X.

1.5 ENFERMEDAD DE McARDLE. GLUCOGENOSIS TIPO V

1.5.1 DEFINICIÓN

La enfermedad de McArdle (Glucogenosis tipo V, GSD V; MIM # 232600) es una miopatía metabólica causada por mutaciones en el gen *PYGM* que codifica la isoforma muscular del enzima glucógeno fosforilasa (Miofosforilasa *PYGM*; α -1,4-glucan ortofosfato glucosiltransferasa; EC 2.4.1.1) (Nogales-Gadea, et al., 2007). Es una miopatía pura pues sólo se afecta la isoforma muscular de la citada enzima.

Es una de las miopatías metabólicas más frecuentes, con una prevalencia estimada de 1/100000 habitantes (Rommel, et al., 2006). Pertenece al grupo de las glucogenosis o enfermedades de almacenamiento del glucógeno (GSD) que producen afectación del músculo esquelético, como la enfermedad de Pompe (GSD II), la enfermedad de Cori (GSD III) y la enfermedad de Tarui (GSD VII). La herencia es autosómica recesiva.

1.5.2 GLUCOGENO FOSFORILASA MUSCULAR (GPM)

Cataliza la fosforólisis de los enlaces alfa α -1,4-glucosil del glucógeno para formar α -D-glucosa-1-fosfato, según la reacción:



En humanos existen 3 isoformas; forma hepática (GPL, codificada por el cromosoma 14), cerebral (también llamada fetal, GPB, codificada por el cromosoma 10) y muscular (GPM, codificada por el cromosoma 11). El cerebro y el corazón, expresan la GPB y la GPM, mientras que el hígado expresa exclusivamente la GPL (DiMauro, 1995). En el músculo esquelético inmaduro, se expresan la GPB y la GPM, en el proceso de maduración muscular la isoforma fetal va siendo reemplazada por la isoforma muscular, presente exclusivamente en las fibras musculares adultas.

La GPM, existe como un homodímero (M2) que se compone de dos subunidades idénticas de 97.440 Da cada una (842 aminoácidos) (Lukacs, et al., 2006). El centro activo de GPM contiene piridoxal fosfato. Es una enzima alostérico bajo control positivo y negativo, de forma que ligandos intracelulares como AMP (principal modulador alostérico) y glucógeno, activan la enzima favoreciendo la formación del

confórmero R activo, mientras que glucosa, glucosa-6-P y nucleósidos de purina inhiben la actividad estabilizando el confórmero T inactivo (Hudson, et al., 1993).

Los dímeros se asocian formando un tetrámero que es la forma enzimáticamente activa o fosforilasa "a". La GPM, tiene dos formas interconvertibles: una es la forma defosforilada de baja actividad (GPM "b") y la otra es la forma fosforilada de alta actividad (GPM "a"). El paso de la forma inactiva a la activa es catalizado por el enzima fosforilasa b quinasa mediante la fosforilación del residuo ser14. La fosforilasa b quinasa está formada por cuatro subunidades distintas ($\alpha\beta\gamma\delta$)₄ (la subunidad γ es la calmodulina) y está a su vez regulada por la proteínquinasa dependiente de AMP cíclico.

Algunas hormonas como el glucagón y la epinefrina (adrenalina) influyen en el metabolismo del glucógeno, provocando su degradación. La actividad muscular induce la liberación de epinefrina desde la médula adrenal. La epinefrina estimula la degradación de glucógeno principalmente en músculo y en menor medida en hígado. El proceso consta de una serie de reacciones en cascada (figura 8):

- 1) Una vez liberadas las moléculas de epinefrina y de glucagón se unen a su receptor específico en la membrana plasmática (7TM) de las células musculares y hepáticas respectivamente. La epinefrina se une a su receptor β -adrenérgico en las células musculares. Este hecho activa la subunidad α de la proteína G.
- 2) La unión de guanosín trifosfato (GTP) a la subunidad α de la proteína G, activa a la adenilato ciclasa, proteína que cataliza la formación de un segundo mensajero, el AMP cíclico (AMPc).
- 3) Las concentraciones elevadas de AMPc activan a la *proteína quinasa a* mediante la unión de éste a las subunidades reguladoras, disociándose así estas de las catalíticas, que quedan activadas.
- 4) Por último, la *proteína quinasa a*, fosforila a la subunidad β de la fosforilasa quinasa, la cual a su vez fosforila a la fosforilasa b inactiva, activándose la glucógeno fosforilasa que comienza a degradar el glucógeno.

La cascada del AMPc amplifica de manera notable los efectos de las hormonas. Así, la unión de una cantidad pequeña de hormonas a sus receptores conlleva la movilización de una gran cantidad de moléculas de glucógeno.

Tanto la forma fosforilada “a” como la defosforilada “b”, poseen dos posibles conformaciones; *i*) estado R (activo), *ii*) estado T (inactivo). La GPM tiene varios puntos de unión de ligandos (figura 9): a) centro catalítico, que se une a la glucosa para pasar a estado T de baja actividad; b) centro alostérico, al que se une el AMP para activarla (paso a forma R); c) centro inhibidor, al que se unen purinas, nucleótidos, nucleósidos y flavopiridol para inducir el estado T, con bloqueo del centro catalítico; d) centro de unión al glucógeno, que cataliza la destrucción de sus residuos (inhibido por el ciclodextrano); y e) “nuevo centro alostérico”, descrito recientemente (Pinotsis, et al., 2003).

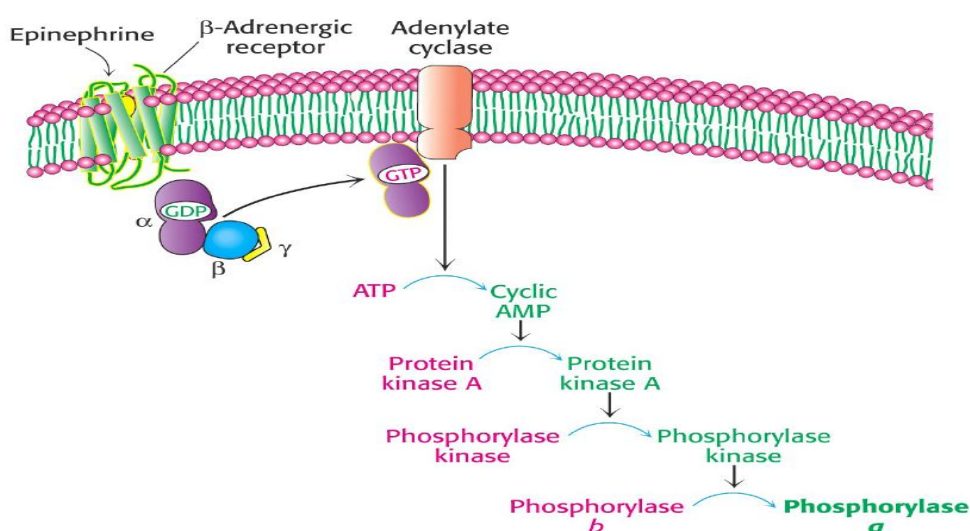


Figura 8. Mecanismo de activación de la degradación de glucógeno.

GTP: Guanosín trifosfato, ATP: Adenosín trifosfato, GDP: Guanosín difosfato, Cyclic AMP: AMP cíclico.

Imagen obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=stryer.figgrp.2939>.

El AMP, es un marcador del estado energético celular, además de activar la fosforilasa “b”, activa la ruta glucolítica mediante la activación alostérica de la PFK. Su función es por tanto, aumentar la disponibilidad de glucosa procedente de la degradación del glucógeno para que entre en la vía glucolítica.

El extremo N-terminal se extiende desde el residuo 1 hasta el 482, que contiene la mayoría de los residuos de unión a ligandos, y la mayor parte de los residuos que entran en contacto con residuos del otro monómero (residuos de contacto entre dímeros), y el extremo C-terminal desde el residuo 483 hasta el 842, que contiene la mayoría de los residuos del centro activo y los implicados en la unión al piridoxal fosfato (Hudson, et al., 1993).

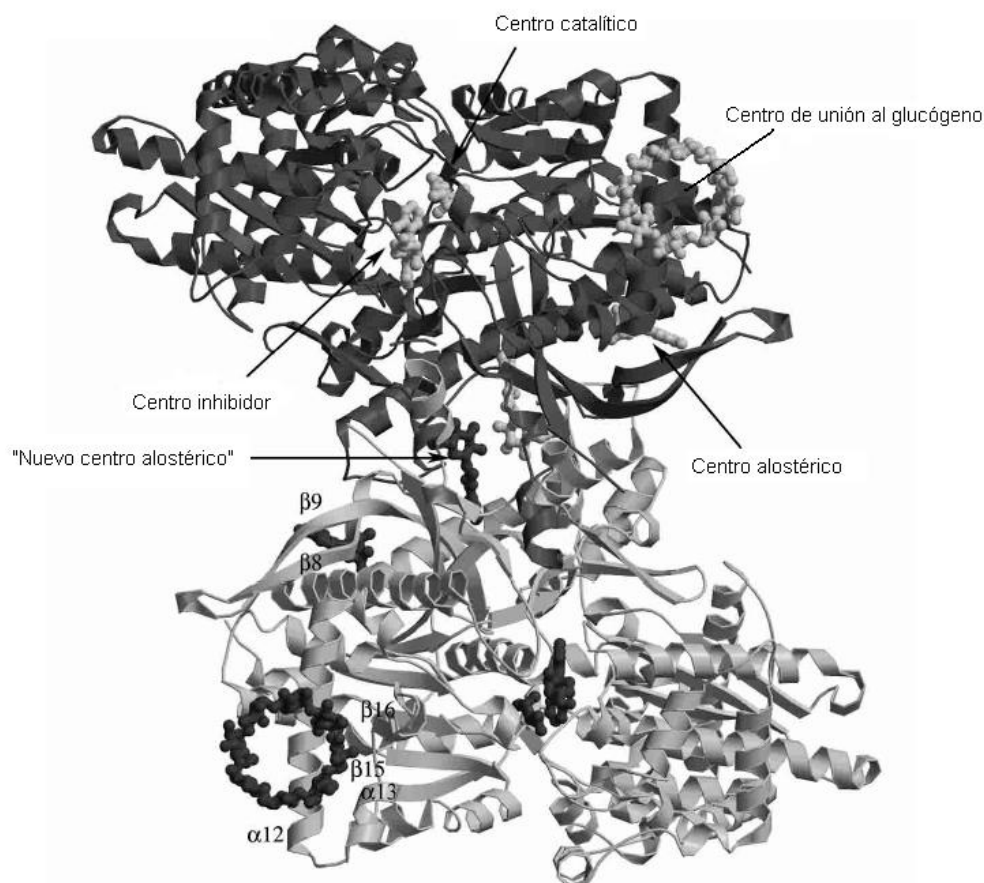


Figura 9. Estructura del enzima GPM “b”.

Imagen modificada obtenida de Pinotsis (Pinotsis, et al., 2003)

Si la GPM pierde su actividad a causa de una alteración molecular, el glucógeno muscular no puede ser degradado en glucosa-1-fosfato, lo que conllevará, *i)* su acúmulo en la célula muscular produciendo una miopatía vacuolar, y *ii)* la ausencia de sustrato (glucosa-1-fosfato) para la glucólisis, apareciendo la sintomatología de los pacientes con enfermedad de McArdle.

La glucógeno fosforilasa muscular es, por tanto, una enzima esencial para la obtención de energía en la fibra muscular, y su deficiencia afecta a la capacidad del músculo esquelético para la realización de actividad física.

1.5.3 EXPRESIÓN CLÍNICA

La primera descripción clínica de la enfermedad se realizó por el Dr. Brian McArdle en 1951. El paciente era un varón de 30 años que refería dolor muscular al realizar esfuerzos físicos y, posteriormente debilidad y rigidez de los músculos que utilizaba.

Estos síntomas remitían rápidamente con el reposo, pero un ejercicio más prolongado e intenso provocaba calambres persistentes e inflamación localizada. En esta descripción seminal de la enfermedad el autor concluía, “que existía un fallo en la degradación de glucógeno hacia ácido láctico” (McArdle, 1951). Unos años después, en 1959, dos grupos describieron de manera simultánea el defecto enzimático responsable de la enfermedad (Mommaerts, et al., 1959; Schmid and Mahler, 1959).

En general, la sintomatología es variable con intolerancia al ejercicio con cansancio prematuro, mialgias, rigidez, debilidad y contracturas musculares. Normalmente el reposo permite reducir la expresión clínica (Tsujino, et al., 1995b). Se han descrito tanto pacientes prácticamente asintomáticos o con una leve IE, como individuos con debilidad fija y atrofia.

El inicio de los síntomas se suele producir en la infancia, pero el diagnóstico se realiza en la segunda o tercera década de vida ya que manifestaciones clínicas tales como calambres y mioglobinuria, no se suelen producir antes de los 10 años de edad.

De manera general se puede decir que existen dos tipos de ejercicio; *i)* tipo aeróbico; nadar, correr, ir en bicicleta, etc., y *ii)* tipo anaeróbico; de mayor intensidad o duración; escalar, levantar pesas, etc. Durante los primeros minutos de cualquier tipo de ejercicio la GPM convierte el glucógeno almacenado en las fibras musculares en glucosa, que es utilizada en la glucólisis, produciéndose ATP. Cuando el ejercicio es aeróbico, los sustratos utilizados dependen del tipo, intensidad, duración del ejercicio, condición física y dieta. En reposo el sustrato principal utilizado para sintetizar ATP, son los AGL en sangre, que mediante la β -oxidación producen acetil-coenzima A, que dentro de la mitocondria se metaboliza a través del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa para generar ATP. En función de los requerimientos energéticos el músculo puede producir ATP a partir de la glucólisis anaeróbica, la glucosa sanguínea, la glucogenólisis y la glucólisis aeróbica (DiMauro, 1995).

En los pacientes con enfermedad de McArdle hay gran variedad de ejercicios capaces de causar los síntomas. En general, aquellos que conllevan contracción isométrica, por ejemplo sujetar un objeto sin que haya desplazamiento (levantamiento de peso), o los ejercicios aeróbicos menos intensos pero de mayor duración, como subir escaleras o montar en bicicleta.

Los pacientes con enfermedad de McArdle presentan un fenómeno patognomónico de la enfermedad (Vissing and Haller, 2003a) denominado “segundo aliento” (Pearson, et al., 1961). El cual se produce por una mayor disponibilidad de sustratos de origen no muscular por movilización secundaria durante el ejercicio, sobre todo glucosa y ácidos grasos libres, y un aumento del flujo sanguíneo muscular local (Braakhekke, et al., 1986; Haller and Vissing, 2004; Vissing and Haller, 2003a), que también puede ser inducido mediante la inyección intravenosa de glucosa o fructosa. El “segundo aliento” aparece en todos los pacientes con enfermedad de McArdle después de 5-8 minutos del comienzo del ejercicio físico (Haller and Vissing, 2002; Quinlivan and Beynon, 2004).

Otro rasgo clínico habitual (50% de los pacientes), es la aparición de mioglobinuria, pudiendo incluso causar fracaso renal si las crisis son graves (DiMauro, 1995). Algunos pacientes muestran como manifestación clínica principal debilidad muscular permanente con afectación de los músculos proximales más que de los distales.

Se ha descrito algún caso de forma grave con déficit de GPM de presentación neonatal (forma infantil fatal) (DiMauro and Hartlage, 1978; Milstein, et al., 1989).

Existe pues un amplio espectro de manifestaciones clínicas. No se conocen las razones que puedan explicar esta variabilidad, pero algunas evidencias sugieren que deben existir algunos genes que puedan actuar como moduladores fenotípicos. En este sentido se han considerado diversos genes relacionados con la capacidad física para determinar si alguno de ellos pudiera modular de alguna manera el fenotipo clínico de los pacientes con enfermedad de McArdle. Especialmente se han estudiado, el gen de la mioadenilato desaminasa, *AMPD1*, y el gen de la enzima convertidora de angiotensina, *ACE*. Parece ser que la presencia en homocigosis de la mutación c.34C>T en el gen *AMPD1*, puede producir un fenotipo más severo de la enfermedad en aquellos pacientes que presenten un doble fallo genético (Martinuzzi, et al., 2003; Rubio, et al., 1997). En cuanto al gen *ACE*, se ha estudiado la presencia de un polimorfismo de inserción/delección (*I/D*). El alelo corto, *D*, está relacionado con una mayor actividad del enzima convertidora de angiotensina, y el alelo largo con la inserción, *I*, con una actividad menor. Parece que la presencia del polimorfismo *I/D* puede jugar un papel como modulador (Martinuzzi, et al., 2003), aunque otros autores no encuentran esa relación (Paradas, et al., 2005). Posiblemente sea necesario aumentar el número de pacientes estudiados para poder obtener resultados con mayor significación estadística.

Recientemente se ha establecido la primera clasificación fenotípica de los pacientes con enfermedad de McArdle. En ella los pacientes se agrupan en cuatro niveles en función de la gravedad creciente del fenotipo clínico (tabla 2) (Martinuzzi, et al., 2003).

Tabla 2. Escala de Gravedad Clínica de los pacientes*

**(Martinuzzi, et al., 2003).*

Grado 0	Pacientes casi asintomáticos, que presentan como único síntoma relevante la <u>fatiga</u>
Grado 1	Pacientes sintomáticos, con <u>dolor</u> , <u>contracturas</u> y /o <u>calambres</u>
Grado 2	Pacientes que han presentado <u>mioglobinuria</u>
Grado 3	Pacientes con <u>debilidad fija</u> o <u>atrofia</u> muscular proximal en cinturas escapular y/o pelviana

1.5.4 DIAGNÓSTICO

Tradicionalmente el diagnóstico de la enfermedad de McArdle se basa en los síntomas clínicos junto con estudios bioquímicos e histológicos. Existen varias pruebas que permiten determinar la presencia de la enfermedad:

I. Determinación de la creatina quinasa sérica (CK)

Los niveles séricos de CK, aportan una información importante, dado que los pacientes con enfermedad de McArdle presentan en suero de forma persistente niveles elevados de esta enzima, con cifras en torno a 1000 U/L (valor de referencia < 170 U/L). Además, la medida de CK permite realizar un diagnóstico diferencial, al poder distinguir de otra miopatía metabólica, como es el déficit de Carnitina Palmitoil Transferasa, en la cual el aumento en los niveles de CK en los pacientes afectados suele ser raro.

II. Prueba de ejercicio en isquemia

Desde la primera descripción de la enfermedad por el Dr. Brian McArdle, en la que se indicaba la incapacidad de los músculos esqueléticos de los pacientes para producir lactato durante el ejercicio físico, como consecuencia del bloqueo de la vía glucogenolítica por el déficit de GPM, se introdujo una prueba funcional de ejercicio en isquemia para diagnosticar a los pacientes (McArdle, 1951). El fundamento de esta prueba se basa en la estimulación al máximo de la glucólisis muscular durante el ejercicio isquémico y la determinación de lactato y amonio (sirve como control de la prueba) producido. Para ello se coloca un catéter en la vena antecubital, y se realiza una primera toma de sangre en condiciones basales, a continuación se sitúa un esfigmomanómetro en el antebrazo del paciente inflándolo por encima (unos 50 mmHg) de su presión arterial, después el paciente comienza a realizar ejercicio abriendo y cerrando la mano durante 1 minuto, tras finalizar el ejercicio se toman muestras sanguíneas para medir lactato a los minutos 1, 3, 5 y 10.

En los individuos sanos se produce un aumento de lactato entre 3 y 5 veces respecto al valor basal. En los pacientes con enfermedad de McArdle no se observa dicho aumento y se obtiene una curva plana respecto al tiempo, mientras que la curva de amonio será normal o con respuesta exagerada y sirve para detectar falsos positivos. Si bien es una prueba con aplicabilidad diagnóstica, presenta algunos problemas; *i)* depende en gran medida, de la capacidad y colaboración del paciente para realizar el test, *ii)* existe variabilidad preanalítica en la medida del lactato sérico, *iii)* existe riesgo de que se produzca un síndrome compartimental (causado por la inflamación muscular resultante de la necrosis y de la disminución del flujo sanguíneo local), como consecuencia de la prueba (Lindner, et al., 2001).

Se ha indicado la posibilidad de realizar esta prueba diagnóstica en ausencia de isquemia (Kazemi-Esfarjani, et al., 2002), siendo esta metodología muy útil para el diagnóstico de alteraciones en la glucólisis, sin producir las complicaciones que genera el test isquémico.

III. Prueba en cicloergómetro

Es una prueba fisiológica, en la que se monitoriza el ritmo cardiaco durante el pedaleo en un cicloergómetro cuando se ejerce una resistencia constante al mismo, con el fin de detectar la aparición del fenómeno del “segundo aliento” que es patognomónico en

esta enfermedad (Vissing and Haller, 2003a). La prueba realizada de manera controlada, a un ritmo moderado con una carga constante de trabajo. Es un método específico, sensible y simple para diagnosticar pacientes con GSD V (Vissing and Haller, 2003a).

IV. Espectroscopia por resonancia magnética de fosforo MRS-P³¹

Es un método adecuado para diagnosticar pacientes con GSD V, mediante la caracterización del perfil metabólico (Martinuzzi, et al., 2008; Siciliano, et al., 1995). Esta técnica se basa en la utilización de campos magnéticos de elevada intensidad y radiofrecuencias de estímulo diferentes a las empleadas en resonancia para los átomos de hidrógeno. Se utiliza para detectar 'in vivo' y cuantificar la presencia de compuestos químicos aislados en la composición de los tejidos o estructuras, analizando el espectro de resonancia obtenido y comparándolo con elementos conocidos.

V. Biopsia muscular

- Microscopia óptica y electrónica

Se encuentran diferencias en el tamaño de las fibras musculares, las fibras tipo I suelen presentar atrofia, y se observan vacuolas subsarcolemas e interfibrilares con acúmulo de glucógeno que se detectan mediante la tinción del ácido peryódico de Schiff -PAS- (figura 10) (DiMauro and Bresolin, 1986).

- Histoquímica

Existe una reacción histoquímica para la determinación de miofosforilasa (Takeuchi and Kuriaki, 1955) basada en la elongación de las cadenas periféricas del glucógeno endógeno en presencia de glucosa-1-fosfato. En los pacientes no se produce tinción en la fibra muscular (figura 11), pero si en el músculo liso. Pueden existir falsos positivos cuando; *i*) existe actividad residual del enzima (Engel, 1963), *ii*) cuando existen fibras regenerativas inmaduras, que expresan la isoforma fetal (GPB), sobre todo si la biopsia se ha realizado en un periodo cercano a una crisis de mioglobinuria cuando la regeneración celular es más activa (Mitsumoto, 1979).

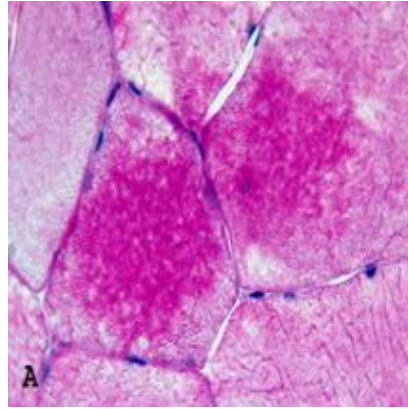


Figura 10. Microscopio óptico: Músculo estriado de un paciente con Enfermedad de McArdle: Tinción PAS, muestra acumulo de glucógeno.

Imagen obtenida de www.ispub.com

- Actividad bioquímica de miofosforilasa

Se determina espectrofotométricamente la actividad bioquímica de miofosforilasa en homogenado muscular. Es un método enzimático que mide el aumento de absorbancia a 340 nm, causado por el NADPH formado a partir de una serie de reacciones acopladas que se producen en el caso de que la GPM presente actividad. Se utiliza AMP como activador de la fosforilasa b (DiMauro, et al., 1979).

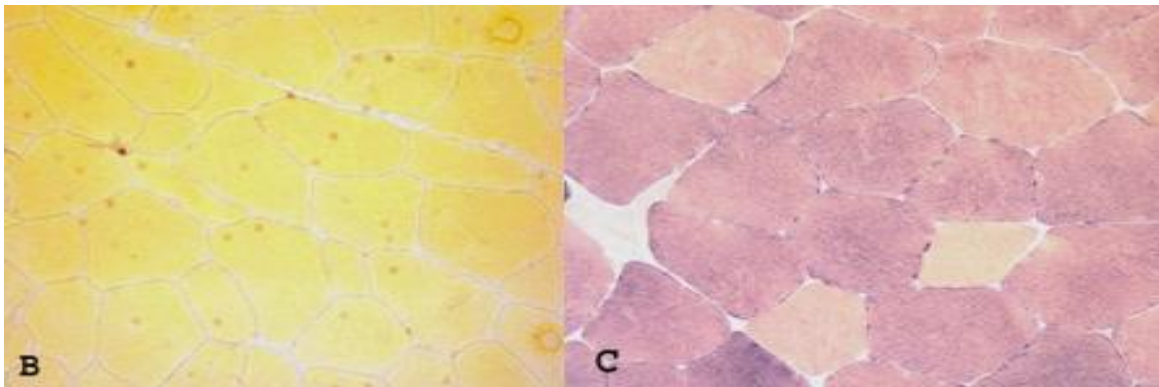


Figura 11. Microscopio óptico: Tinción de fosforilasa. Músculo estriado de un paciente con enfermedad de McArdle (panel B) y un control (panel C).

Imagen obtenida de www.ispub.com

1.5.5 FISIOPATOLOGÍA

Existen dos mecanismos que permiten explicar la intolerancia al ejercicio asociada a esta enfermedad. Por un lado el déficit de miofosforilasa priva al organismo del sustrato para la glucólisis anaeróbica, clave para la fase inicial de la contracción muscular, y por otro, la imposibilidad de metabolizar aeróbicamente el glucógeno provoca su depósito intracelular en las fibras de músculo estriado, limitándose el ejercicio dinámico cuando el $\text{VO}_{2\text{max}}$ es superior al 50% (Dimauro, et al., 2002).

La incapacidad inicial de los pacientes puede explicarse por la alteración del metabolismo oxidativo que limita la producción de piruvato para su entrada en el ciclo de Krebs. Además, existe una menor capacidad por parte de la insulina para controlar la oxidación de los carbohidratos, por resistencia a su mecanismo (Gordon, 2003; Nielsen, et al., 2002; Vissing and Haller, 2003a).

Los síntomas se producen al no poderse cubrir los requerimientos energéticos de la fibra muscular. El consumo de ATP del medio intracelular y la falta de renovación del mismo, junto con la disminución de los niveles de fosfocreatina, explicaría por qué todos aquellos mecanismos que requieren ATP para su realización pueden verse afectados, disminuidos o bloqueados, como son las realizadas por la ATPasa Na^+/K^+ o la ATPasa Ca^{2+} (Haller, et al., 1998). La falta de actividad de estas bombas produce un desequilibrio en el potencial de membrana que explica la elevación de K^+ extracelular y plasmático durante el ejercicio (Clausen, 2003). Al defecto contráctil que se produce como consecuencia de lo anterior se debe sumar, el bajo nivel de las bombas de Na^+ en las fibras musculares (Haller, et al., 1998).

La fatiga inicial puede deberse al acúmulo de ADP debido a su inadecuada fosforilación, al disminuir los niveles de sustrato para la misma, y a la falta de acidificación intracelular por parte del lactato, que disminuye el rendimiento de la vía de la creatina quinasa. El ADP, es convertido en AMP, IMP, amonio y productos de degradación de adenina, incluyendo inosina, hipoxantina y ácido úrico (“hiperuricemia miogénica”) (Zange, et al., 2003). Además, como se ha indicado anteriormente la fosforilación oxidativa puede estar alterada, estando la producción de piruvato procedente de la glucólisis limitada, con lo que se reduce la formación de acetil coenzima A y su entrada en el ciclo de Krebs (Gross, 1997).

Las causas de las contracturas musculares no están del todo claras, si bien el agotamiento de ATP y la incapacidad de resíntesis del mismo mediante la glucólisis anaerobia parece un aspecto clave, sin embargo medidas de RMN-P³¹ (Argov and Bank, 1991), no han permitido observar una depleción de ATP, ni en la fatiga prematura, ni en las contracturas inducidas por el ejercicio isquémico. Alteraciones de los mecanismos que regulan las interacciones patológicas de las proteínas contráctiles con el calcio podrían ser una explicación de las mismas (Gordon, 2003). El dolor muscular estaría producido por isquemia local relativa en el músculo contraído.

La mioglobulinuria es causada por la necrosis de las fibras musculares, producida por los mismos mecanismos que producen la fatiga y las contracturas, aunque sostenidos en el tiempo y/o de mayor intensidad (Marchand, et al., 2002). La afectación por crisis de mioglobulinuria parece ser mayor en hombres que en mujeres (sólo el 13% del total). Esta particularidad puede explicarse por la menor capacidad de las mujeres a participar en ejercicios extenuantes.

La debilidad persistente se relaciona con el daño muscular permanente y la consecuente pérdida de fibras musculares. La debilidad conlleva, aún en ausencia de mioglobulinuria una incapacidad para cumplir con las exigencias mecánicas requeridas por el músculo.

El ejercicio produce en estos pacientes una respuesta cardiocirculatoria hiperdinámica, con hiperventilación y taquicardia como mecanismos fisiológicos de adaptación que permiten aumentar la disponibilidad de combustible energético y oxígeno procedentes del plasma. A pesar de la hiperventilación el consumo máximo de oxígeno se encuentra alrededor del 35-40% del valor normal (O'Dochartaigh, et al., 2004), pero este efecto es producido por la marcada inactividad física en los pacientes, lo que lleva aparejado una limitación para la oxidación de ácidos grasos y de la síntesis de acetil-coenzima A, más que por el bloqueo implícito de la glucogenolisis.

1.5.6 TRANSMISIÓN GENÉTICA

La enfermedad se transmite de manera autosómica recesiva, sin embargo se han descrito algunos casos de heterocigotos manifiestos (Manfredi, et al., 1993), es decir pacientes que presentan la enfermedad, pero en los que solo se ha identificado un único defecto genético en el gen *PYGM*, lo que parece justificarse por una baja

actividad de miofosforilasa, inferior a un determinado umbral 20-40% (Martinuzzi, et al., 2003) o por una transmisión pseudodominante. En este sentido se han descrito 3 familias con esta herencia aparentemente pseudodominante (Hadjigeorgiou, et al., 2002b; Isackson, et al., 2005; Tsujino, et al., 1993). Es necesario profundizar en los estudios moleculares de las mismas, complementándolos con estudios moleculares a nivel de cDNA, para determinar si existe algún otro defecto molecular que participe en la enfermedad y que no pueda ser detectado mediante estudios con DNA genómico (Fernandez-Cadenas, et al., 2003; Sohn, et al., 2008). También es importante considerar la existencia de motivos situados tanto en zonas codificantes, como no codificantes, que son claves en la correcta identificación de los sitios de “corte y empalme de exones”, y que son diferentes de las señales clásicas, estos elementos pueden actuar como potenciadores (ESEs) o silenciadores (ESSs) de “corte y empalme de exones” (Chao, et al., 2001; Mankodi and Ashizawa, 2003).

I. Gen *PGYM*

El gen *PGYM* (MIM # 608455) ha sido clonado, secuenciado y asignado al locus 13 del brazo largo del cromosoma 11 (Lebo, et al., 1984), y fue identificado como causante de la enfermedad en 1993. El gen abarca unas 14.2 Kb de secuencia genómica, contiene una región codificante de 2529 pb con 20 exones, y la proteína que codifica presenta 842 aminoácidos (Tsujino, et al., 1993).

II. Heterogeneidad genética

En 1993, fue descrita la primera mutación causante de la enfermedad (Tsujino, et al., 1993) y, desde entonces se han identificado hasta la fecha, 104 mutaciones distintas (tabla 3) causantes de la enfermedad en pacientes de todo el mundo (Andreu, et al., 2007; Aquaron, et al., 2007; Delmont, et al., 2008; Deschauer, et al., 2007; Fernandez-Cadenas, et al., 2007; Rubio, et al., 2007a; Sohn, et al., 2008; Tsujino, et al., 1993; Vieitez, et al., 2008), lo que demuestra la amplia heterogeneidad molecular de la enfermedad. Las mutaciones en el gen *PYGM*, reducen o eliminan la actividad muscular del enzima. Estas incluyen mutaciones terminadoras, mutaciones con cambio de aminoácido, deleciones, inserciones, y mutaciones y polimorfismos que afectan al corte y empalme de exones. Las mutaciones pueden afectar al contacto entre los dímeros, o pueden alterar las interacciones por puentes de hidrogeno afectando a la unión de sustratos. Las mutaciones terminadoras que producen

codones de terminación prematura (PTCs) predicen proteínas truncadas, además pueden producir alteraciones a nivel transcripcional (Daegelen, et al., 1983). Los polimorfismos “silentes” también pueden afectar al procesamiento del mRNA, apareciendo transcritos aberrantes, siendo por tanto estos polimorfismos patogénicos (Fernandez-Cadenas, et al., 2003). Adicionalmente se ha observado a nivel de cDNA, que cambios nucleotídicos a nivel de regiones no codificantes pueden afectar al correcto corte y empalme de los exones (Bruno, et al., 2006), es por ello que los estudios moleculares basados en cDNA son necesarios para caracterizar adecuadamente a los pacientes a nivel molecular (diagnosticar definitivamente a los llamados “heterocigotos manifiestos”, y para poder determinar el efecto de las mutaciones a nivel de procesamiento del mRNA) (Sohn, et al., 2008), (Garcia-Consuegra, et al., 2008, J Med Genet, 2008, aceptado para publicación).

III. Mutaciones en el gen *PYGM*

La mutación más frecuente en pacientes de raza blanca es un cambio C>T en el nucleótido 148 en el exón 1, una mutación terminadora p.R50X, es decir una Arginina es sustituida por un codón de terminación, y se obtiene una proteína truncada susceptible a la degradación (Arenas and Martin, 2003). Diferentes estudios de grandes series de pacientes indican una distribución homogénea de esta mutación en diferentes países, así constituye el 81% de los alelos en pacientes del Reino Unido (Bartram, et al., 1994), el 64% en los de Estados Unidos (el-Schahawi, et al., 1996), el 56% en los de Alemania (Vorgerd, et al., 1998), el 43% en los Italia (Bruno, et al., 2006), el 31% en los de Holanda (Martin, et al., 2004), el 72% en los de Francia (Aquaron, et al., 2007) y el 55% en los de España (Martin, et al., 2001a).

La segunda mutación más frecuente en el gen *PYGM*, es la mutación con cambio de aminoácido p.G205S que representa 10% de alelos en pacientes Americanos y 9% de alelos en pacientes españoles (Martin, et al., 2001a; Tsujino, et al., 1993). Sin embargo, tanto la mutación p.R50X como la p.G205S, no se han encontrado nunca en pacientes japoneses. Se han descrito mutaciones “privadas”, encontradas únicamente en una población determinada, como ejemplo se puede indicar la delección p.F710del (Sugie, et al., 1995) asociada a población japonesa, y la mutación con cambio de aminoácido p.W798R, que se ha encontrado en el 16,5% de pacientes españoles (Martin, et al., 2001a).

Los exones 14 y 17 del gen *PYGM* presentan una alta incidencia de mutaciones (Andreu, et al., 2007; Nogales-Gadea, et al., 2007), aproximadamente la cuarta parte de las mutaciones descritas pertenecen a estos denominados “*exones calientes*” (tabla 3).

La enfermedad de McArdle se caracteriza por una gran heterogeneidad genética. Hasta la fecha de elaboración de este trabajo, se han descrito en la literatura 104 mutaciones diferentes (tabla 3): 55 mutaciones con cambio de aminoácido, 18 deleciones, 14 mutaciones terminadoras, 10 intrónicas (2 afectan al corte y empalme de exones, 7 cuyo efecto es desconocido y 1 deleción que comprende parte del intrón 16, el exón 17, y parte del intrón 17), 3 mutaciones del/ins, 1 mutación que afecta al corte y empalme de exones, 2 duplicaciones, y 1 inserción.

Considerando las mutaciones incluidas en la zona codificante del gen *PYGM*, 44 mutaciones afectan al extremo amino-terminal (que se extiende desde el residuo 1 hasta el 482) y 50 al extremo carboxi-terminal (desde el residuo 483 hasta el 842), por lo que la distribución de las mutaciones afecta de igual manera a ambos dominios.

Se han descrito en los últimos estudios diferentes mutaciones denominadas “privadas”, es decir que solo han sido encontradas en un grupo de población determinado. Como ejemplo, se puede indicar las deleciones TTC 708/709, 779delE características de pacientes asiáticos (Sohn, et al., 2008; Tsujino, et al., 1994b), las descritas en población italiana (Bruno, et al., 2006), las descritas en población francesa (Aquaron, et al., 2007; Delmont, et al., 2008) o las descritas en población española (Fernandez, et al., 2000; Rubio, et al., 2000a; Vieitez, et al., 2008).

IV. mRNA

El mRNA del gen *PYGM*, tiene un tamaño de 3.4 Kb. Los estudios de Northern blot realizados son bastante heterogéneos en cuanto a sus resultados (Gautron, et al., 1987; McConchie, et al., 1990; Servidei, et al., 1988). Los estudios de los transcritos del gen *PYGM*, se han demostrado necesarios para determinar el efecto de las variantes sinónimas, mutaciones que afectan al mecanismo de corte y empalme de exones, mutaciones de terminación e incluso mutaciones de cambio de aminoácido (Fernandez-Cadenas, et al., 2003). Adquiriendo más importancia en los denominados

heterocigotos manifiestos, o en aquellos pacientes en los que no se hayan encontrado mutaciones patogénicas (Fernandez-Cadenas, et al., 2003).

Tabla 3. Mutaciones en el gen PYGM

(Datos a octubre de 2008)

Ex/Int	Codón	Secuencia	Cambio aminoacídico	Tipo Mutación	Cita bibliográfica
1	1	c.1A>C	p.M1L	SE	(Tsujino, et al., 1995b)
1	1	c.1A>G	p.M1V	SE	(Vorgerd, et al., 1998)
1	5	c.13_14delCT	p.L5VfsX22	Delección	(Rubio, et al., 2006)
1	16	c.46delGinsTT	p.V16FfsX12	Del/Ins	(Bartram, et al., 1994)
1	26/27	c.78_79delITG	p.E27AfsX50	Delección	(Isackson, et al., 2005)
1	50	c.148C>T	p.R50X	Stop	(Tsujino, et al., 1993)
1	53	c.159C>G	p.Y53X	Stop	(Hadjigeorgiou, et al., 2002a)
1	73	c.211_217dupCGCAGCA	p.Q73HfsX7	Duplicación	(Rubio, et al., 2007a)
2	83	c.247A>T	p.I83F	SE	(Rubio, et al., 2007a)
2	85	c.255C>A	p.Y85X	Stop	(Deschauer, et al., 2003)
2	94	c.280C>T	p.R94W	SE	(Deschauer, et al., 2003)
2	102	c.304delA	p.N102TfsX4	Delección	(Bruno, et al., 2006)
3	116	c.347T>C	p.L116P	SE	(Gamez, et al., 1999)
3	125	c.373G>T	p.E125X	Stop	(Martin, et al., 2001a)
3	134	c.402delC	p.N134KfsX161	Delección	(Rubio, et al., 2007a)
3	136	c.407G>A	p.G136D	SE	(Aquaron, et al., 2007)
3	139	c.415C>T	p.R139W	SE	(Martin, et al., 2004)
4	157	c.470G>T	p.G157V	SE	(Deschauer, et al., 2007)
4	159	c.475G>A	p.G159R	SE	(Bruno, et al., 2006)
4	161	c.481C>T	p.R161C	SE	(Deschauer, et al., 2007)
4	170/171	c.509_511delAGA	p.delK170_171	Delección	(Aquaron, et al., 2007)
4	174	C.521G>A	p.G174D	SE	(Rubio, et al., 2007a)
5	194	c.580C>T	p.R194W	SE	(Martin, et al., 2000b)
5	205	c.613G>A	p.G205S	SE	(Tsujino, et al., 1993)
5	215	c.645G>A	-	Desconocido	(Garcia-Consuegra, et al., 2008)*
6	230	c.689C>G	p.P230R	SE	(Bruno, et al., 2006)
6	239	c.715_717delGTC	p.V239del	Delección	(Bruno, et al., 2006)
7	270	c.808C>T	p.R270X	Stop	(Deschauer, et al., 2001)
8	292	c.875T>C	p.L292P	SE	(Tsujino, et al., 1994b)
8	337	c.1010A>G	p.Q337R	SE	(Deschauer, et al., 2007)
9	349	c.1045G>A	p.E349K	SE	(Martin, et al., 2001a)
9	362	c.1086G>A	p.W362X	Stop	(Bruno, et al., 1999b)
10	365	c.1094C>T	p.A365V	SE	(Bruno, et al., 2006), (Rubio, et al., 2007a)
10	379	c.1136C>T	p. .T379M	SE	(Aquaron, et al., 2007)

10	384	c.1147G>A	P.E383K	SE	(Deschauer, et al., 2007)
10	384	c.1151C>A	p.A384D	SE	(Bruno, et al., 2006)
10	385	c.1155_1156delGG	p.E386AfsX89	Deleción	(Deschauer, et al., 2007)
10	388/390	c.1162_1169del TGGCCGGTinsA	p.W388SfsX34	Del/Ins	(Martin, et al., 2001b)
10	397	c.1190T>C	p.L397P	SE	(Tsujino, et al., 1995b)
11	428	c.1282C>T	p.R428C	SE	(Bruno, et al., 2006)
11	449	c.1345G>C	p.G449R	SE	(Aquaron, et al., 2007)
11	450	c.1349C>T	p.S450L	SE	(Deschauer, et al., 2007)
11	453	c.1354insC	p.A453RfsX22	Inserción	(Deschauer, et al., 2007)
11	456	c.1366G>A	p.V456M	SE	(Mancuso, et al., 2003)
12	486	c.1458G>A	p.G486D	SE	(Deschauer, et al., 2007)
12	488	c.1463C>A	p.T488N	SE	(Rubio, et al., 2000b)
12	488	c.1463C>T	p.T488I	SE	(Aquaron, et al., 2007)
12	490	c.1469G>A	p.R490Q	SE	(Aquaron, et al., 2007)
12	490	c.1366G>A	p.R490W	SE	(Rubio, et al., 2007a)
12	491	c.1471C>T	p.R491C	SE	(Bruno, et al., 2006)
12	491	c.1470dupG	p.R491AfsX7	Duplicación	(Rubio, et al., 2007a)
12	492	c.1475G>A	p.W492X	Stop	(Bruno, et al., 2006)
12	494	c.1480delG	p.V494FfsX45	Deleción	(Dimauro, et al., 2002)
13	511	c.1531delG	p.D511TfsX28	Deleción	(Tsujino, et al., 1994a)
13	534	c.1601delA	p.D534VfsX5	Deleción	(Martin, et al., 2001a)
14	541	c.1621G>T	p.E541X	Stop	(Bruno, et al., 1999a)
14	543	c.1627A>T	p.K543X	Stop	(Bruno, et al., 2006)
14	543	c.1628A>C	p.K543T	SE	(Tsujino, et al., 1993)
14	570	c.1709G>A	p.R570Q	SE	(Aquaron, et al., 2007)
14	570	c.1708C>T	p.R570W	SE	(Deschauer, et al., 2007)
14	574	c.1722 T>G	p.Y574X	Stop	(Gamez, et al., 2003)
14	575	c.1725A>G	p.K575E	SE	(Deschauer, et al., 2007)
14	576	c.1726C>T	p.R576X	Stop	(Vorgerd, et al., 1998)
14	577	c.1730A>G	p.Q577R	SE	(Rubio, et al., 2007a)
14	587	c.1760T>C	p.L587P	SE	(Paradas, et al., 2005)
14	590	c.1769G>A	p.R590H	SE	(Aquaron, et al., 2007)
15	599	c.1797delT	p.F599LfsX6	Deleción	(Martin, et al., 2004)
15	602	c.1804C>T	p.R602W	SE	(Martin, et al., 2001a)
15	602	c.1805G>A	p.R602Q	SE	(Hadjigeorgiou, et al., 2002b)
15	609	c.1827G>A	-	Splicing	(Gamez, et al., 2003)
16	650	c.1948C>T	p.R650X	Stop	(Deschauer, et al., 2007), (Aquaron, et al., 2007)
16	655	c.1963G>A	p.E655K	SE	(Tsujino, et al., 1995b)
17	657/726	c.1970_2177del	p.V657_G726del	Deleción	(Bruno, et al., 2006)
17	660	c.1979C>A	p.A660D	SE	(Martin, et al., 2000a)
17	662	c.1985A>C	p.D662A	SE	(Vieitez, et al., 2008)
17	666	c.1996C>G	p.Q666E	SE	(Vorgerd, et al., 1998)
17	685	c.2053A>T	p.N685Y	SE	(Andreu, et al., 1999)

17	686	c.2056G>A	p.G686R	SE	(Vorgerd, et al., 1998)
17	686	c.2056G>C	p.G686R	SE	(Martinuzzi, et al., 1999)
17	687	c.2059G>C	p.A687P	SE	(Bruno, et al., 2002)
17	692	c.2075_2076delCCinsAAA	p.T692KfsX30	Del/Ins	(Quintans, et al., 2004)
17	704	c.2111C>T	p.A704V	SE	(Martin, et al., 2001a)
17	705	c.2113_2114delGG	p.G705RfsX16	Delección	(Bruno, et al., 2006)
17	710	c.2128_2130delTTC	p.F710del	Delección	(Tsujino, et al., 1994b)
18	715	c.2143C>T	p.R715W	SE	(Aquaron, et al., 2007)
18	754	c.2262delA	p.K754NfsX49	Delección	(Kubisch, et al., 1998)
18	755	c.2263C>T	p.Q755X	Stop	(Martin, et al., 2001a)
19	779	c.2337_2339delAGA	p.779delE	Delección	(Sohn, et al., 2008)
19	784	c.2352C>A	p.C784X	Stop	(Rubio, et al., 2007a)
20	795/796	c.2385_2386delAA	p.E797VfsX18	Delección	(Martin, et al., 2000b)
20	798	c.2392T>C	p.W798R	SE	(Rubio, et al., 2000a), (Fernandez, et al., 2000)
20	814	c.2441G>A	p.S814N	SE	(Delmont, et al., 2008)
20	815	c.2444A>C	p.D815A	SE	(Bruno, et al., 2006)
20	826	c.2477G>C	p.W826S	SE	(Bruno, et al., 2006)
Int 4	-	c.529-8G>A	p.Q176_M177insVQ	Splicing	(Garcia-Consuegra, et al., 2008)*
Int 6	-	c.772 -2A>T	-	Desconocido	(Deschauer, et al., 2007)
Int. 7	-	c.855 +1G>C	-	Desconocido	(Bruno, et al., 2006)
Int. 9	-	c.1092 +1G>A	-	Desconocido	(Bruno, et al., 2006)
Int. 9	-	c.1093 -1G>T	-	Desconocido	(Bruno, et al., 2006)
Int. 10	-	c.1239 +1G>A	-	Desconocido	(Bruno, et al., 2006)
Int. 14	-	c.1768 +1G>A	p.V568AfsX16	Splicing	(Tsujino, et al., 1994b)
Int. 16	-	c.(1969+214)_(2177+369)del	p.V657_G726del	Delección	(Garcia-Consuegra, et al., 2008)*
Int 18	-	c.2312 +3G>C	-	Desconocido	(Aquaron, et al., 2007)
Int. 19	-	c.2380 -1G>A	-	Desconocido	(Bruno, et al., 2006)

Ex/Int; Exón/Intrón, Del/ins; Delección/Inserción, SE; Mutación con cambio de aminoácido, Stop; Mutación terminadora, Splicing; corte y empalme de exones. *(Garcia-Consuegra, et al., 2008, J Med Genet, 2008, aceptado para publicación)

1.5.7 TRATAMIENTO

No existe un tratamiento “curativo” de la enfermedad, aunque se puede hablar de soluciones paliativas que permitan mejorar la sintomatología clínica de los pacientes. A pesar del amplio conocimiento de la fisiopatología y genética de la enfermedad de McArdle, se han conseguido aún pocos avances a nivel terapéutico, la mayoría centrados en la ingestión oral de sacarosa previa al ejercicio y el propio entrenamiento físico (Haller, et al., 2006; Lucia, et al., 2007b; Mate-Munoz, et al., 2007). Los

tratamientos encaminados a mejorar la disponibilidad de sustratos que permitan mejorar la tolerancia al ejercicio han mostrado un efecto limitado (Quinlivan and Beynon, 2004).

I. Tratamientos farmacológicos y nutricionales

- Creatina monohidrato. La creatina se sintetiza normalmente en el riñón, mientras que en el músculo hay un transportador sodio dependiente. La fosfocreatina puede donar fosfatos de alta energía, y refosforilar ADP a ATP. La ingesta de creatina mejora la capacidad muscular en el entrenamiento de resistencia (Vandenberghe, et al., 1997). En un ensayo con 9 pacientes con baja dosis de creatina, el resultado del estudio mostró una mejora en la capacidad de realización de ejercicio isquémico e isométrico (Haller, 2000), no proviniendo este efecto positivo de un aumento de los niveles de fosfocreatina muscular. En otro estudio de este grupo de investigadores, se valoró la ingesta de dosis más altas de creatina en 19 pacientes (Vorgerd, et al., 2002), los resultados indicaron un empeoramiento en la sintomatología de los pacientes induciéndose mialgia.
- Glucosa. Se ha evaluado la ingesta oral antes de la práctica de ejercicio. El resultado de un ensayo en un grupo de 12 pacientes con la enfermedad, mostró una disminución del ritmo cardiaco máximo (Vissing and Haller, 2003b), lo cual puede ser una “terapia” útil cuando se prevé realizar un ejercicio vigoroso. Pero algunos autores indican que existe un riesgo de sobrepeso al tomar glucosa de manera continuada.
- Dietas de carbohidratos y proteínas. En un reciente estudio (Andersen and Vissing, 2008) realizado en 7 pacientes, se comparó el efecto de una dieta rica en hidratos de carbono y de una dieta rica en proteínas. Se determinó la tolerancia al ejercicio y la carga máxima de trabajo soportada en un cicloergómetro. La dieta rica en hidratos de carbono mostró un 25% de mejora en la capacidad oxidativa de trabajo máximo. Esta dieta no solo mejoró la capacidad de trabajo sino que también se observó un efecto preventivo frente a episodios de daño muscular causados por la enfermedad.

En otro estudio con un único paciente de 9 años de edad, se demostró una recuperación en la tolerancia al ejercicio tras un año de seguimiento. Al paciente

se le recomendó realizar las actividades físicas naturales de su edad, pero manteniendo una dieta pre-ejercicio (con 20 gramos de carbohidratos) con el objetivo de aumentar la glucosa sanguínea con la ingestión de los carbohidratos (Perez, et al., 2008).

En cuanto a las dietas ricas en proteínas se han publicado algunos trabajos que reportaban casos individuales. Uno de los estudios analizó una terapia basada en la combinación de ejercicio físico y una dieta rica en proteínas (Slonim and Goans, 1985), aunque el entrenamiento aeróbico por sí mismo es capaz de mejorar la capacidad oxidativa y la resistencia en pacientes con McArdle (Haller, et al., 2006; Perez, et al., 2008; Perez, et al., 2007a).

- **Sacarosa.** La sacarosa es el azúcar más abundante en la dieta y se metaboliza muy rápidamente a glucosa y fructosa tras su ingesta. En un estudio con 12 pacientes la toma de sacarosa mejoró notoriamente la tolerancia al ejercicio y disminuyó el riesgo de mioglobinuria (Vissing and Haller, 2003b). El tratamiento se considera eficaz únicamente durante el periodo habitual de aparición de los síntomas en este tipo de enfermos (Perez, et al., 2007a). El consumo exógeno de glucosa antes de la práctica de ejercicio junto con un programa de acondicionamiento físico parece ser un modelo de utilidad para los pacientes con esta glucogenosis (Amato, 2003).
- **Moléculas que inducen la lectura de PTCs.** Las mutaciones terminadoras producen la detención prematura de la traducción proteica, y están presentes entre el 5% y el 15% de los pacientes con alteraciones monogenéticas heredadas.

En este sentido, se ha probado el efecto de moléculas capaces de continuar con la síntesis proteica cuando el mRNA presenta PTCs, en enfermedades como la fibrosis quística y las distrofias musculares, donde la presencia de mutaciones que predicen proteínas truncadas es habitual. Entre estas moléculas cabe destacar la gentamicina y el PTC124.

- *Gentamicina.* Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas que actúan a nivel de ribosomas, han sido utilizados como agentes que evitan la lectura de los codones de terminación prematura, permitiendo la síntesis de proteínas de tamaño completo en enfermedades hereditarias, como la fibrosis quística (Wilschanski, et al., 2003). Sin embargo, en pacientes con

distrofia muscular de Duchenne o de Becker, no han mostrado cambios ni en la fuerza muscular ni en la expresión de la proteína afectada (distrofina) tras tratamiento con gentamicina (Wagner, et al., 2001).

La enfermedad de McArdle es un modelo interesante para evaluar el efecto terapéutico de la gentamicina, ya que la mayor parte de los pacientes portan mutaciones terminadoras (la mutación p.R50X es la más frecuente en la mayoría de las poblaciones estudiadas). Un aumento en la actividad bioquímica de miofosforilasa podría suponer una mejora notable en la sintomatología de los pacientes. La gentamicina se ha probado en un número muy limitado de pacientes con enfermedad de McArdle por lo que los resultados no son concluyentes. En 4 pacientes tratados con este antibiótico los resultados no mostraron ningún beneficio en el metabolismo energético y por tanto en el fenotipo clínico de los pacientes (Schroers, et al., 2006).

- *PTC124*. Es una molécula desarrollada por *PTC Therapeutics (New Jersey, USA)*, que al igual que los aminoglucósidos induce la lectura de PTCs en el mRNA y por tanto permite la síntesis proteica, lo que en determinadas enfermedades podría ser un hecho clave en la recuperación de la actividad proteica y en la mejora clínica de los pacientes.

Esta molécula, produjo una recuperación en la actividad de distrofina en cultivos primarios de células musculares de humanos y de ratones mdx (carentes de distrofina) que portan mutaciones terminadoras en sus alelos, y permitió rescatar la función del músculo estriado en ratones en un periodo estimado de entre 2 a 8 semanas (Welch, et al., 2007).

La inyección o administración oral de PTC124, en un modelo murino de fibrosis quística, produjo la supresión del alelo que porta la mutación terminadora p.G542X demostrándose mediante inmunofluorescencia la recuperación de la proteína en células intestinales (Du, et al., 2008).

Actualmente se están desarrollando ensayos clínicos en fase II, tanto en voluntarios (Hirawat, et al., 2007), como en pacientes con distrofia muscular de Duchenne y con fibrosis quística (Aurino and Nigro, 2006).

Todos estos datos avalan el potencial terapéutico de esta molécula para el tratamiento de enfermedades genéticas causadas por mutaciones terminadoras, y por tanto, se abre la posibilidad de ensayar este fármaco en pacientes con enfermedad de McArdle.

- Vitamina B6 (piridoxal fosfato). Entre el 80-90% de la vitamina B6 está unida a fosforilasa, pero este pool de vitamina B6 probablemente no es accesible metabólicamente (Haller, et al., 1983). Existen pocos estudios relacionados con el uso de vitamina B6 y la enfermedad de McArdle. En uno de ellos, se indicó el beneficio causado por la suplementación con vitamina B6 (Phoenix, et al., 1998). Aunque en otro estudio con un grupo de 10 pacientes y 10 controles, en el que se evaluó la fatigabilidad y la fuerza producida, no se observaron diferencias entre ambos grupos (Quinlivan and Beynon, 2004).
- Ramipril. Durante los últimos años se han realizado algunos estudios que indican el posible papel modulador de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en el fenotipo de los pacientes con enfermedad de McArdle (Gomez-Gallego, et al., 2008; Martinuzzi, et al., 2003; Paradas, et al., 2005). La existencia de un polimorfismo de inserción/delección (I/D) del gen *ACE*, está relacionado con la disminución o aumento de la actividad de ECA. La inhibición farmacológica de ECA puede teóricamente mejorar la capacidad física.

El Ramipril es un inhibidor bien conocido de ECA, su administración mejoró la capacidad para practicar ejercicio físico y la fuerza muscular en pacientes con cardiomiopatía y en mujeres hipertensas (Onder, et al., 2002). En un reciente estudio (Martinuzzi, et al., 2008) ha evaluado el efecto de este fármaco en 8 pacientes con enfermedad de McArdle, los autores no observaron cambios significativos en el fenotipo de los pacientes con el uso del inhibidor, aunque por otro lado se produjo un aumento en el $VO_{2\text{pico}}$ en tres individuos con el genotipo *D/D* (ECA), aunque el número de pacientes es demasiado pequeño para obtener conclusiones significativas.

- Hábitos diarios, existen tres recomendaciones básicas:
 - Evitar el ejercicio isométrico intenso y el ejercicio aeróbico máximo.
 - Evitar un estilo de vida sedentario, que conducirá a un desacondicionamiento físico aun mayor que el que provoca la enfermedad.
 - Realizar ejercicio aeróbico moderado de manera controlada, lo que mejorara la capacidad circulatoria y aumentara la disponibilidad de sustratos, una especie de efecto de “segundo aliento” permanente (Ollivier, et al., 2005).

- Basándose en dos recientes revisiones sistemáticas de los tratamientos nutricionales y farmacológicos ensayados (Quinlivan and Beynon, 2004; Quinlivan, et al., 2008), se concluye;
 - No hay evidencia de que ningún tratamiento nutricional y/o farmacológico produzca beneficios en la enfermedad de McArdle.
 - El uso de dosis bajas de creatina produce una mejora, aunque modesta en el ejercicio isquémico en un número reducido de pacientes.
 - La ingesta de oral de sacarosa previa la realización de ejercicio físico, mejora la tolerancia al mismo. Pero puede producir ganancia de peso, y no es útil si se realiza ejercicio de manera inesperada.
 - Las dietas con carbohidratos parecen mejorar la tolerancia al ejercicio en los pacientes y minimizar los síntomas.
 - No se ha encontrado ningún tipo de efecto con la administración oral de; D-ribosa, glucagón, aminoácidos de cadena ramificada, y verapamil.

II. Tratamiento de las complicaciones

Cuando los pacientes sufren crisis de mioglobinuria, deben ser hidratados con la mayor rapidez posible, para preservar su función renal. Se ha de administrar suero salino de forma intravenosa hasta la desaparición de la mioglobinuria o que los niveles de CK sean menores de 1000 UI/L. Cuando el daño de la función renal se considera inevitable, se deberá practicar una hemodiálisis (Sauret, et al., 2002). Otras consideraciones serían la corrección de la hiperkaliemia y/o la hipocalcemia, que sólo se trataría en caso de ser sintomática.

III. **Entrenamiento aeróbico**

En las últimas dos décadas numerosos estudios científicos han mostrado los efectos beneficiosos que el entrenamiento físico programado produce en aquellas patologías o procesos de la vida que cursan con una disminución significativa de la función muscular como son las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, el cáncer, o el envejecimiento (Fisher, et al., 2008; Haller, et al., 2006; Jeppesen, et al., 2006; Newton and Galvao, 2008).

Los pacientes con enfermedad de la McArdle, presentan una susceptibilidad a las complicaciones asociadas al esfuerzo, consecuencia del bloqueo metabólico que presentan, como son mialgias, calambres, mioglobinuria, etc. Esta situación les hace adoptar comúnmente un estilo de vida sedentario, lo cual generalmente, no hace más que empeorar la intolerancia al ejercicio que presentan al reducir aún más la limitada capacidad oxidativa causada por la imposibilidad de degradar el glucógeno muscular almacenado (Haller, et al., 2006; Perez, et al., 2007b).

Durante los últimos años, se ha estudiado el efecto del entrenamiento aeróbico en varios grupos de pacientes con GSD V. En un estudio con 5 pacientes con miopatía mitocondrial y 5 pacientes con enfermedad de McArdle (Chaussain, et al., 1992), se valoró la adaptación metabólica y respiratoria al ejercicio, los resultados mostraron que estos pacientes pueden mejorar la producción muscular mediante el entrenamiento de resistencia, al estimular éste el metabolismo lipídico.

En otro trabajo con 8 pacientes con GSD V, se indicó que el ejercicio aeróbico moderado, fue un medio eficaz de mejorar la capacidad física por el aumento en la circulación de “combustibles” procedentes del metabolismo mitocondrial (Haller, et al., 2006).

En otro estudio con 9 pacientes (Mate-Munoz, et al., 2007) se observó que el ejercicio realizado mediante condiciones controladas puede practicarse de manera segura, respondiendo los pacientes favorablemente al entrenamiento, mejorándose con este los principales indicadores de capacidad de ejercicio medidos (potencia pico, VO_{2pico} y umbral ventilatorio). Lo que proporciona una opción terapéutica adicional que puede ayudar a normalizar el estilo y calidad de vida de estos pacientes.

También se han descrito algunos casos individuales, en los que se recomienda la necesidad de practicar ejercicio físico con el objetivo de disminuir el desacondicionamiento físico de los pacientes con enfermedad de McArdle y mejorar así su calidad de vida (Lucia, et al., 2007b; Perez, et al., 2006; Perez, et al., 2007a; Perez, et al., 2007b).

IV. Terapia génica

Como en la gran mayoría de las enfermedades de carácter genético, la posibilidad de desarrollar un tratamiento definitivo, podría pasar por la terapia génica. Existen dos modelos naturales de enfermedad en animales, uno en vacas de raza *Charolais*, y otro en ovejas de raza *Merino* (Angelos, et al., 1995; Tan, et al., 1997; Tsujino, et al., 1996).

Se han utilizado adenovirus recombinantes que incluían el cDNA completo de la miofosforilasa, para infectar mioblastos procedentes de pacientes y de ovejas con enfermedad de McArdle, restaurándose la actividad enzimática del enzima (Pari, et al., 1999). La inyección de vectores de adenovirus modificados y virus adeno-asociados conteniendo secuencias de expresión de miofosforilasa en el músculo semitendinoso de una oveja con enfermedad de McArdle, produjo expresión de miofosforilasa en fibras regenerativas (Howell, et al., 2008).

1.5.8 MODULADORES FENOTÍPICOS

Existe una gran variabilidad en el fenotipo clínico de los pacientes con enfermedad de McArdle, desde aquellos que son asintomáticos (diagnosticados por tener algún familiar afecto) hasta aquellos que muestran una intolerancia extrema al ejercicio.

En este sentido se han descrito 9 casos de inicio tardío, sin ningún tipo de síntoma durante la mayor parte de la vida (Wolfe, et al., 2000) y se han documentado al menos 3 casos de una forma infantil fatal de la enfermedad (DiMauro and Hartlage, 1978; Milstein, et al., 1989; Miranda, et al., 1979).

En otros casos el único síntoma clínico ha sido fracaso renal agudo sin factores atribuibles que lo pudieran precipitar en al menos dos casos (Tabata, et al., 1986) (Mittal, et al., 1995). Además se han observado presentaciones con episodios de

rabdomiolisis relacionados con factores precipitantes inusuales, como disnea y asma (Tsushima, et al., 2001; Voduc, et al., 2004).

Por otra parte, se han publicado alteraciones metabólicas asociadas o en concurrencia con la enfermedad de McArdle, hecho conocido comúnmente como “doble problema”. Así, existen casos de déficit asociado con mioadenilato desaminasa (Rubio, et al., 2000c; Tsujino, et al., 1995a), con enfermedades mitocondriales (Mancuso, et al., 2003; Rubio, et al., 1998), con hipertermia maligna (Isaacs, et al., 1989), y con miastenia gravis (Lucia, et al., 2007b).

Esta variabilidad clínica contrasta con la aparente homogeneidad bioquímica de los pacientes con GSD V, en los que la actividad de miofosforilasa es indetectable en casi todos ellos (McConchie, et al., 1990).

Actualmente se piensa que las variantes genéticas de ciertos genes relacionados con la función muscular y/o que influyen en la capacidad de ejercicio (*ACE* y *AMPD1* entre otros), podrían actuar como modificadores de la expresión fenotípica de la enfermedad (Martinuzzi, et al., 2003). Además otras variables como la edad y el sexo, pueden afectar al fenotipo clínico de la enfermedad (Rommel, et al., 2006).

I. Enzima convertidora de angiotensina (ECA)

El gen que codifica la enzima convertidora de angiotensina (ECA), se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (17q23), se compone de 25 exones con 20.546 pares de bases. Contiene una región codificante de 4.195 pb, y la proteína que codifica presenta 1.306 aminoácidos. Es un componente integral del sistema Renina-Angiotensina (SRA), que es importante en la regulación del volumen sanguíneo, la presión arterial, la función cardíaca y vascular (figura 12).

La renina se sintetiza y almacena como una forma inactiva, llamada prorenina, en las células yuxtaglomerulares renales. En situaciones de hipotensión o bajo estimulación simpática, la prorenina es activada y se libera a la circulación del organismo como renina (Guyton, 1992; Kem and Brown, 1990). Su función es actuar sobre una proteína plasmática el angiotensinógeno, liberando un péptido de 10 aminoácidos, la angiotensina I que ejerce función vasoconstrictora débil. La renina permanece en sangre unos 30 minutos, formándose durante ese periodo angiotensina I.

La ECA, presente en el endotelio de los vasos pulmonares, convierte la angiotensina I en angiotensina II (Sonna, et al., 2001). La angiotensina II, es un vasoconstrictor muy potente, actúa aumentando la resistencia vascular y la presión arterial. La vasoconstricción es mediada por la misma ECA, que degrada la bradiquidina (vasodilatador) (Kem and Brown, 1990).

La angiotensina II, regula la presión arterial a largo plazo mediante la retención de sodio y agua, mediante dos mecanismos: *i)* induce en las glándulas suprarrenales la secreción de aldosterona, que a su vez aumenta la reabsorción de sodio y agua por los riñones, *ii)* promueve directamente la retención de agua y sodio por los riñones.

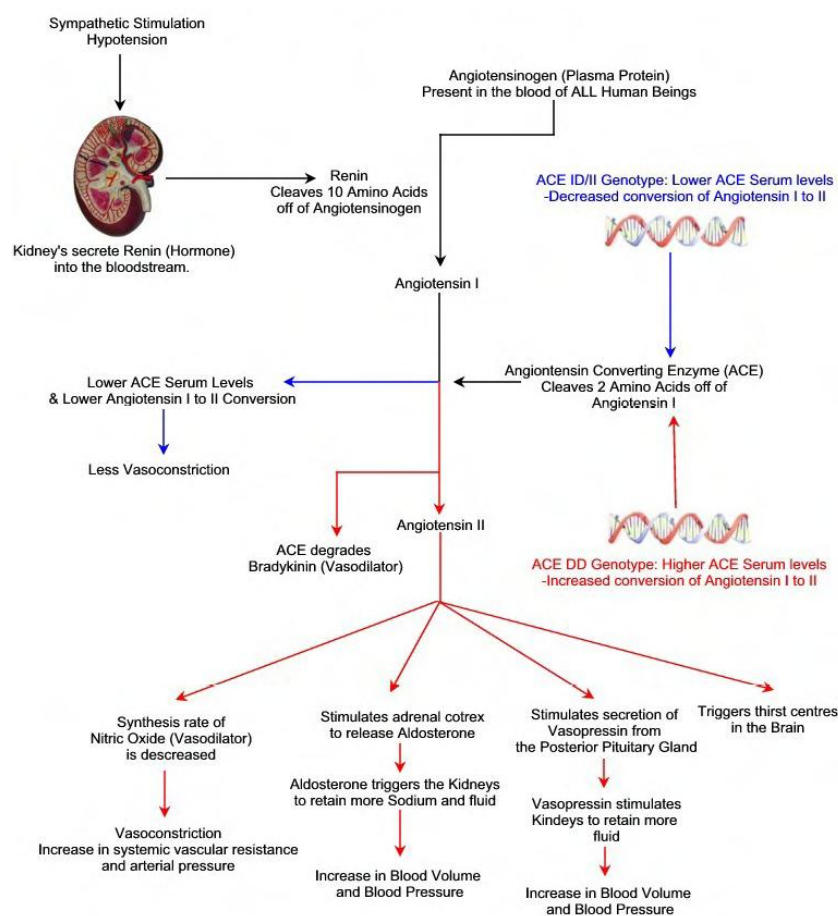


Figura 12. Sistema Renina-Angiotensina.

Imagen obtenida de; www.utc.edu/Administration/DepartmentalHonors/Maynelan.pdf

Los dos alelos de la ECA, difieren en cuanto a la presencia (inserción o alelo *I*) o ausencia (delección o alelo *D*) de una secuencia repetitiva *Alu* de 287 pb, en el intrón 16 (Rieder, et al., 1999). La presencia del alelo *D*, se relaciona con un aumento de actividad sérica de la ECA, con lo cual aumenta la conversión de angiotensina I a

angiotensina II, produciéndose una mayor vasoconstricción. Mientras que la presencia del alelo *I*, se relaciona con una disminución de la actividad sérica de ECA (Tiret, et al., 1992).

Este polimorfismo *I/D*, se ha examinado en diferentes patologías prevalentes tales como diabetes, alzheimer, y enfermedades cardiovasculares (Bozkurt, et al., 2008; Kolsch, et al., 2005). También se han hecho estudios en atletas de élite, para determinar si existe un condicionamiento genético que ofrezca una ventaja o mayor rendimiento, en la práctica de un determinado tipo de actividad física o prueba atlética (Rankinen, et al., 2006).

Cuando los atletas se agrupan en función de la disciplina atlética que practican, entre velocistas y fondistas, en la literatura se indica que los deportistas de resistencia presentan una mayor presencia del alelo *I*, mientras que el alelo *D* es más habitual en velocistas (Lucia, et al., 2005b; Myerson, et al., 1999). La disminución de la actividad ECA, por la presencia del alelo *I*, supone una menor vasoconstricción y por tanto un mayor aporte oxígeno al tejido muscular. Es decir los individuos con uno o dos alelos *I*, teóricamente tendrán una ventaja en la práctica de ejercicios de resistencia (ciclismo, natación, carreras de fondo, etc.)

En cuanto a la posible relación del gen *ACE*, con la enfermedad de McArdle, en 2003 se describió por primera vez una posible asociación de la gravedad clínica de los pacientes con GSD V y la presencia del polimorfismo *I/D* del gen *ACE*. En este trabajo se evaluaron 47 pacientes, y los autores indicaron, que la presencia de uno o dos alelos *D*, está sobre-representada en los enfermos con mayor gravedad clínica (Martinuzzi, et al., 2003). En este sentido, esta posible relación ha sido cuestionada por otros autores (Paradas, et al., 2005), aunque se trata de un estudio familiar.

Si, la presencia del alelo *I*, supone una menor actividad de ECA, y por tanto un mejor rendimiento físico, es posible que la inhibición farmacológica de ECA pueda teóricamente mejorar la capacidad física. Esta hipótesis no se ha demostrado en individuos sanos, pero en un estudio realizado en mujeres con hipertensión y de edad avanzada, con actividad física disminuida, se concluye que el uso de inhibidores de ECA, puede detener o ralentizar la pérdida de fuerza muscular (Onder, et al., 2002).

La inhibición de ECA, debería atenuar la producción de angiotensina II, y la degradación de bradiquinina, aumentando la disponibilidad de angiotensina I,

favoreciéndose de esta forma la vasodilatación y la liberación de sustratos de manera sistémica y local. Además la inhibición de ECA puede afectar a la composición de la miosina de cadena pesada, favoreciendo las isoformas más resistentes a fatiga (aeróbicas) (Martinuzzi, et al., 2008).

II. α -actinina-3. Gen *ACTN3*

El gen *ACTN3*, se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 (11q13). El gen comprende 16.407 bases de secuencia genómica, y se compone de 21 exones. Contiene una región codificante de 2.858 pb, y la proteína que codifica presenta 901 aminoácidos. La presencia de un polimorfismo en el exón 16, debido a una mutación puntual en la región codificante c.1747C>T (p.R577X) (North, et al., 1999), se ha estudiado ampliamente en deportistas de élite, por la posible influencia del mismo en la capacidad atlética (Rankinen, et al., 2006).

La expresión de α -actinina-3 se limita a las fibras musculares tipo II o de contracción rápida (Vincent, et al., 2007). La α -actinina-3 es una proteína que juega un papel decisivo en el proceso de contracción de la célula muscular, forma parte de las α -actininas sarcoméricas, que son componentes importantes de la línea Z, donde desarrollan su función: *i*) actuar como punto de anclaje, conectándose a los filamentos de actina, y *ii*) mantener el ordenamiento de los miofilamentos y la contracción coordinada de los mismos (Blanchard, et al., 1989).

La línea Z del sarcómero tiene como función proporcionar ayuda estructural para la transmisión de la fuerza cuando se activan las fibras musculares durante las contracciones poderosas, típicas en las fibras musculares tipo II (contracción rápida).

La presencia de la mutación puntual c.1747C>T en el exón 16, produce un cambio del aminoácido arginina por un triplete de terminación (p.R577X). El resultado es un déficit de α -actinina-3. Aproximadamente el 18% de la población mundial tiene una deficiencia congénita de α -actinina-3, que no se asocia a ninguna patología, posiblemente debido a que existen otros factores compensadores del déficit de α -actinina-3 en las líneas Z de las fibras rápidas del músculo esquelético.

La variante genética que codifica para la α -actinina-3 funcional (p.R577R), se cree que es beneficiosa para los atletas que utilizan principalmente las fibras musculares tipo II durante su ejercicio. Así, se ha demostrado en diferentes estudios esta asociación

entre el genotipo de α -actinina-3 y la capacidad atlética. En un estudio realizado en 2003, en un grupo de atletas australianos de élite se analizó la asociación entre el genotipo p.R577R y la capacidad atlética. Estratificando el grupo de deportistas en dos subgrupos (en función de su disciplina atlética), velocistas y atletas de fondo o resistencia, cuando se compararon frente a controles se obtuvieron los siguientes resultados (Yang, et al., 2003). El grupo de velocistas tenía una mayor frecuencia del genotipo RR (53%), mientras que los de resistencia tenían una mayor frecuencia del genotipo XX (24%), frente al grupo control (RR 30% y XX 18% respectivamente). Estos datos indican que alelo normal p.R577R puede tener un efecto beneficioso en aquellos deportistas que realizan disciplinas deportivas que implican velocidad extrema (Yang, et al., 2003). Evidencias similares se han obtenido en otros estudios realizados también con deportistas de élite (Lucia, et al., 2006; Niemi and Majamaa, 2005).

Por lo tanto la presencia de α -actinina-3, tiene un efecto positivo en la función muscular, permitiendo generar contracciones intensas a alta velocidad, lo que proporciona una ventaja evolutiva aumentando el rendimiento en pruebas de alta intensidad y velocidad. Se observa también un efecto del genotipo diferente en función del sexo, en los dos subgrupos. En mujeres velocistas, el alelo p.R577X en heterocigosis se presenta en un porcentaje mayor del esperado, mientras que fondistas se produce la situación contraria, el alelo p.R577X se presenta en un porcentaje menor al esperado (Yang, et al., 2003).

III. Mioadenilato desaminasa. Gen *AMPD1*

El gen *AMPD1*, se localiza en el cromosoma 1 (1p13) (Sabina, et al., 1990). El gen comprende aproximadamente 22.455 pb de secuencia genómica, y se compone de 16 exones. Contiene una región codificante de 2.341 pb, y la proteína que codifica presenta 747 aminoácidos (Fishbein, 1986). El gen *AMPD1*, produce dos tipos de transcritos en el sistema osteomuscular adulto: un transcrito denominado “normal” y otro “alternativo” producto de la eliminación del exón 2 mediante el mecanismo de corte y empalme de exones, codificando ambos transcritos una proteína funcional (Morisaki, et al., 1993).

La mioadenilato desaminasa (MADA) es la isoforma específica muscular de la enzima AMP desaminasa, es un homotetrámero y cataliza la desaminación de AMP a IMP, en el músculo esquelético, liberando amonio (figura 13) (Gross, 1997). Existen otros dos

genes; *AMPD2*, que codifica para la isoforma hepática (Bausch-Jurken, et al., 1992) y *AMPD3* que codifica para la isoforma eritrocitaria (Mahnke-Zizelman and Sabina, 1992). La isoforma muscular se encuentra fundamentalmente en fibras tipo II (Fishbein, 1984). La deficiencia de esta isoforma (Fishbein, et al., 1978), es causa común de miopatía inducida por el ejercicio y probablemente la causa más habitual de miopatía metabólica en humanos, encontrándose un déficit de MADA en aproximadamente el 2% de las biopsias musculares enviadas para estudios histológicos, observándose también dicho déficit en el 2% de individuos sanos (Norman, et al., 1995).

La actividad de MADA en el músculo esquelético es 10 veces mayor que en cualquier otro tejido (Lowenstein, 1972), hecho que indica la importancia de esta enzima en el metabolismo energético. Muchos factores intervienen en su regulación; disponibilidad de sustratos, control alostérico y unión a miosina. Los niveles fisiológicos de GTP, Pi y las bajas concentraciones de ATP tienen un efecto inhibitor (Raggi and Ranieri-Raggi, 1987).

Durante el ejercicio intenso, se produce una disminución en los niveles de ATP, y un aumento en los de IMP. El ATP es degradado a ADP, y la adenilato quinasa (AK) transfiere una molécula de fosfato de un ADP a otro, produciendo una molécula de ATP y otra de AMP, el AMP es desaminado a IMP y amonio (figura 13) (Gross, 1997). La reacción catalizada por la MADA, permite desplazar la reacción de la AK hacia la formación de ATP, al degradarse rápidamente el AMP formado.

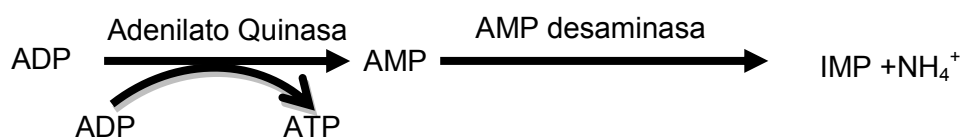


Figura 13. Acoplamiento entre las reacciones catalizadas por adenilato quinasa y AMP desaminasa.

La AMP desaminasa, forma parte del ciclo de los nucleótidos de purina (figura 14), participa en la biosíntesis de fumarato a partir del aspartato. El fumarato se integra en el ciclo de Krebs, y permite la regeneración de ATP a través del mismo (Arenas and Martin, 2003).

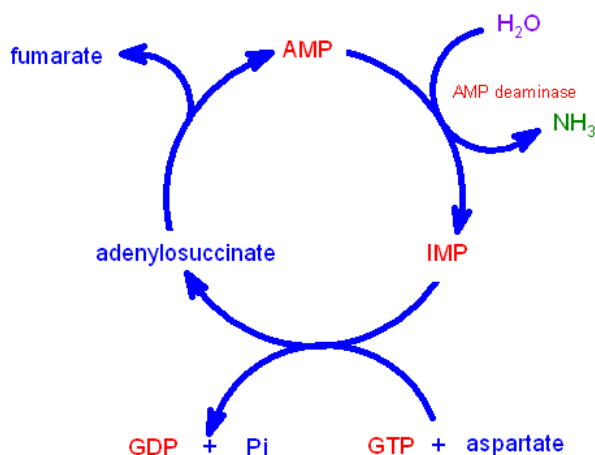


Figura 14. Ciclo de los nucleótidos de purina.

Imagen obtenida de www.med.unibs.it/~marchesi/nucmetab.html

Se ha descrito una alteración molecular asociada a déficit de MADA, es el cambio nucleotídico c.34C>T (Morisaki, et al., 1992), que produce una mutación terminadora, p.Q12X, en el exón 2 del gen *AMPD1*, que predice la biosíntesis de una proteína de tamaño muy reducido fácilmente degradable.

Los individuos con un déficit de MADA, presentan gran variabilidad clínica (Gross, 1997). Se han descrito diferentes situaciones, que plantean dudas en cuanto a que el déficit de MADA, pueda ser primario o adquirido, ya que; *i*) existen casos sin actividad muscular de MADA y sin ningún tipo de manifestación clínica asociada (Gross, 1997), esta ausencia de síntomas en pacientes homocigotos para el cambio c.34C>T, podría ser explicado por el “rescate fenotípico” debido al mecanismo de corte y empalme alternativo del exón 2 del gen *AMPD1* (Morisaki, et al., 1993), *ii*) se han descrito asociaciones de este déficit enzimático a otras alteraciones enzimáticas musculares (Bruno, et al., 1998; Heller, et al., 1987; Reuschenbach and Zierz, 1988), *iii*) el alelo mutante p.Q12X, se ha encontrado en el 12% de la población caucásica y en el 19% de la afroamericana (Morisaki, et al., 1992), en población alemana se han obtenido datos similares para la distribución de este alelo mutante tanto en población general como en individuos con síntomas musculares (Verzijl, et al., 1998), *iv*) en el 2% de biopsias musculares de individuos sanos se observa ausencia de actividad de MADA (Norman, et al., 1995).

Todos estos datos plantean cierta controversia, en cuanto a que el déficit de MADA produzca manifestaciones clínicas asociadas al ejercicio. Existen trabajos que apoyan esta posibilidad (Abe, et al., 2000; Fischer, et al., 2007; Fischer, et al., 2005), y otros

que indican lo contrario (Rubio, et al., 2005; Tarnopolsky, et al., 2001). También puede ser un déficit adquirido consecuencia de una enfermedad neuromuscular primaria, o en último caso se puede presentar asociada de manera casual a otra enfermedad metabólica concomitante (como déficit de MPL, PFK, etc.) (Bruno, et al., 1998; Heller, et al., 1987; Reuschenbach and Zierz, 1988; Rubio, et al., 1997; Rubio, et al., 2000c; Tsujino, et al., 1995a), pudiendo agravarse el fenotipo de la otra alteración. La alta frecuencia de la mutación c.34C>T en heterocigosis puede explicar esta asociación a otras enfermedades metabólicas (Arenas and Martin, 2003).

Se ha estudiado la posible relación del gen *AMPD1*, y una mayor gravedad clínica de los pacientes con McArdle. En un estudio con 47 pacientes con GSD V (Martinuzzi, et al., 2003), los autores no encontraron correlación alguna entre la gravedad clínica de los pacientes y el cambio c.34C>T del gen *AMPD1*. En otro estudio con 6 pacientes españoles homocigotos para la mutación c.34C>T, dos de los cuales presentaban también deficiencia de miofosforilasa, se indicó que el efecto clínico de la combinación de las deficiencias de MADA y GPM parece ser nulo (Rubio, et al., 2000c).

IV. Coactivador-1 α del receptor- γ activado por proliferadores de peroxisomas

El gen *PPARGC1A*, se localiza en el cromosoma 4 (4p15.1) (Esterbauer, et al., 1999). El gen abarca aproximadamente 67 Kb de secuencia genómica, y se compone de 13 exones. Contiene una región codificante de 6.318 pb, y la proteína que codifica presenta 798 aminoácidos. Se expresa y regula varios procesos celulares en diferentes tejidos: músculo esquelético, corazón, riñón, tejido adiposo marrón (Esterbauer, et al., 1999). Es un coactivador de los genes del sistema de fosforilación oxidativa que controlan la oxidación de lípidos y glucosa, induce la biogénesis mitocondrial en condiciones de estrés energético, mediante la coactivación de factores de transcripción nucleares y mitocondriales (Finck and Kelly, 2006; Lucia, et al., 2005a; Puigserver and Spiegelman, 2003; Terada and Tabata, 2004; Tunstall, et al., 2002). Está implicado también en procesos de regulación térmica (Puigserver, et al., 1998).

PPARGC1A es un coactivador del receptor PPAR δ en células musculares. Este receptor nuclear está implicado en la regulación del metabolismo lipídico en tejido muscular esquelético. PPAR δ está relacionado con la oxidación de ácidos grasos y la utilización de triglicéridos en células musculares (Wang, et al., 2003), y con la formación del tipo de fibras musculares (Wang, et al., 2004).

La importancia de este gen en la regulación de la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético ha sido demostrada al observarse una reducción en la expresión de genes y proteínas implicados en el metabolismo mitocondrial en un ratón knock-out para *PPARGC1A* específico de tejido muscular (Arany, et al., 2005; Handschin, et al., 2007).

Estudios en un ratón con sobre-expresión de *PPARGC1A* en tejido muscular, han demostrado una mejora significativa en la capacidad física, tanto con una carga de trabajo a intensidades de ejercicio submáximo, como con un aumento gradual de la carga hasta el agotamiento (Calvo, et al., 2008). Sin embargo, otros autores indican que la sobre-expresión de *PPARGC1A* en tejido muscular, puede producir una disminución de la condición física durante los ejercicios de alta intensidad, probablemente debido a la incapacidad de utilizar el glucógeno muscular almacenado (Wende, et al., 2007).

PPARGC1A se expresa preferentemente en tejido muscular con alto contenido en fibras tipo I. En ratones transgénicos cuando *PPARGC1A* se expresa a niveles fisiológicos, los músculos con fibras tipo II también expresan proteínas características de fibras tipo I, tales como troponina I y mioglobina, presentando además una mayor resistencia a la fatiga inducida eléctricamente. *PPARGC1A* transforma músculos glucolíticos en músculos con fenotipo oxidativo, estando implicado en la formación de tipo de fibras musculares en el músculo esquelético. Tanto en animales como en humanos, el ejercicio produce un aumento de los niveles de mRNA de *PPARGC1A* (Lin, et al., 2002).

Se ha indicado la implicación de *PPARGC1A* en el metabolismo de la glucosa. Ya que, es un regulador clave de la gluconeogénesis hepática, que proporciona sustratos al músculo (Rodgers, et al., 2005), es un activador del gen *GLUT4* (transportador de glucosa dependiente de insulina) (Michael, et al., 2001) e induce la expresión del gen que codifica la piruvato deshidrogenasa quinasa 4 (*PDK4*), regulador negativo de la oxidación de glucosa (Wende, et al., 2005).

Considerando la relevancia de este gen en la función mitocondrial (Stefan, et al., 2007), se ha investigado el efecto que puede provocar la presencia de polimorfismos en varios sentidos tales como: la capacidad para realizar ejercicio físico, la sensibilidad a la insulina, y la afectación de la función mitocondrial, entre otros. Así, se ha indicado que el polimorfismo p.G482S en el gen *PPARGC1A*, está relacionado con una mejor

capacidad aeróbica en humanos (Franks, et al., 2003; Ling, et al., 2004; Lucia, et al., 2005a). Unos niveles bajos de capacidad máxima oxidativa, vienen definida por el consumo máximo de oxígeno (VO_{2max}), que es un factor predictivo independiente de diabetes (Lynch, et al., 1996; Wei, et al., 1999) y de longevidad (Laukkanen, et al., 2002; Lee, et al., 1999). Diferentes estudios han encontrado una asociación entre esta variante genotípica y la diabetes tipo 2, donde la frecuencia del alelo S482 es mayor en pacientes con diabetes (Ek, et al., 2001; Hara, et al., 2002; Muller, et al., 2003).

En humanos han sido varios los estudios realizados que han permitido establecer una relación entre el gen *PPARGC1A*, la capacidad física y su respuesta adaptativa al ejercicio (Franks, et al., 2003; Lucia, et al., 2005a; Rankinen, et al., 2006). En un estudio realizado en una serie de 104 deportistas caucásicos de elite (ciclistas y corredores olímpicos) que desarrollan pruebas de resistencia, se observó una menor presencia del alelo S482 en comparación con la población control (Lucia, et al., 2005a). En cambio en un trabajo recientemente publicado, donde se estudiaron una serie de 102 deportistas de resistencia de origen chino no se observó esta asociación del polimorfismo p.G482S, aunque los autores indican que existe otro polimorfismo p.A2962G que puede estar relacionado con el ejercicio físico en este tipo de población (He, et al., 2008).

1.5.9 OTRAS VARIABLES DE HETEROGENEIDAD CLÍNICA

I. Correlación genotipo-fenotipo

Los pacientes con GSD V presentan una gran homogeneidad bioquímica, casi todos ellos muestran actividad indetectable de miofosforilasa (McConchie, et al., 1990), sin embargo muestran gran variabilidad clínica y genética. Se ha intentado determinar si existen otro tipo de variables que puedan explicar la heterogeneidad clínica de esta patología. Una de ellas ha sido la posible correlación genotipo-fenotipo. En las series de pacientes estudiadas hasta el momento, no parece existir ninguna relación entre la gravedad clínica y el genotipo (Aquaron, et al., 2007; Bruno, et al., 2006; Delmont, et al., 2008; Deschauer, et al., 2007; Martin, et al., 2001a). Es decir, genotipos idénticos cursan con manifestaciones clínicas diferentes (Iyengar, et al., 1997; Papadimitriou, et al., 1990), que van desde los prácticamente asintomáticos hasta aquellos con mialgias severas, mioglobulinuria y/o debilidad o atrofia muscular. En este sentido la mutación

p.R50X se ha descrito en pacientes con forma típica de McArdle, forma de inicio infantil y una forma infantil fatal

II. Variantes sinónimas

Otro aspecto que hasta hace poco tiempo no había sido considerado en esta enfermedad, es la posible patogenicidad de polimorfismos “silentes” (variantes sinónimas), y si dicho efecto puede o no estar relacionado con el fenotipo clínico. En el año 2003, se describió la primera mutación teóricamente silente de esta enfermedad (c.1827G>A), que no genera cambio aminoacídico (p.K609K), y que produce una alteración del mecanismo de corte y empalme de exones a nivel del mRNA. En este caso se observa, un patrón aberrante con distintos transcritos identificados en los estudios realizados a nivel de cDNA, que incluyen desde la eliminación de exones, a la activación de nuevos sitios crípticos y a reorganizaciones exón-intrón (Fernandez-Cadenas, et al., 2003). Esta asociación entre mutaciones puntuales teóricamente silentes y alteraciones en los mecanismos de corte y empalme de exones se ha descrito en otras enfermedades (Valentine, 1998). Es pues necesario reinterpretar el posible efecto patogénico de los polimorfismos, sobre todo cuando estos afectan directamente a las secuencias consenso de corte y empalme de exones.

Recientemente ha sido aceptada para publicación (Garcia-Consuegra, et al., 2008, J Med Genet, 2008, aceptado para publicación) la segunda variante sinónima del gen *PYGM*. En este estudio, dos pacientes portaban en heterocigosis el cambio nucleotídico c.645G>A, que produce la variante sinónima p.K215K, los otros dos alelos presentaban respectivamente la mutación p.R50X y la p.W798R. En ambos pacientes se había secuenciado todo el gen *PYGM* a nivel genómico y todo su cDNA, no encontrándose ninguna otra variante nucleotídica. Además se observó una disminución drástica de mRNA en uno de los pacientes (5% respecto al control), datos que avalan, en principio, la patogenicidad de dicha sustitución nucleotídica (Garcia-Consuegra, et al., 2008, J Med Genet, 2008, aceptado para publicación).

III. Heterocigotos manifiestos

La mayoría de los pacientes son diagnosticados a nivel molecular mediante la secuenciación del gen *PYGM*, pero no todos ellos son caracterizados de manera definitiva mediante estos estudios (Andreu, et al., 1998). En la literatura se han

descrito los llamados “heterocigotos manifiestos” (Manfredi, et al., 1993), es decir aquellos individuos con diagnóstico confirmado en los que se ha identificado mediante estudios moleculares una única mutación en un alelo. Probablemente la segunda mutación se encuentra en una zona no codificante, en la zona promotora del gen o puede ser un polimorfismo que no se haya considerado al no producir cambio de aminoácido. Es por ello, que los estudios a nivel de cDNA, han de ser considerados para obtener información en diferentes sentidos: *i)* identificar el segundo alelo mutante en los llamados “heterocigotos manifiestos”, *ii)* evaluar el efecto que producen a nivel transcripcional las mutaciones descritas en el gen *PYGM*, bien sean mutaciones con cambio de aminoácido, mutaciones terminadoras, deleciones o inserciones, y polimorfismos neutros, *iii)* los estudios de expresión del gen *PYGM*, pueden proporcionar información de los niveles de transcritos del gen, y si estos están o no relacionados con el grado de afectación clínica de los pacientes, o si se asocian con el tipo de mutación presente.

Un estudio en el año 2006 (Andersen, et al., 2006), valoró si los individuos que portaban una única mutación identificada en el gen *PYGM*, presentaban alguna sintomatología valorando a su vez la capacidad oxidativa y la producción de ácido láctico durante la práctica de ejercicio en una prueba en cicloergómetro. La serie constaba de 7 individuos heterocigotos y 11 controles, los autores observaron que la capacidad oxidativa era idéntica en ambos grupos, por lo que se presupone que los “portadores” de una única mutación no han de desarrollar la enfermedad.

IV. Estudios en mRNA

Se estima que la tercera parte de las enfermedades de herencia génica y muchas formas de cáncer están causadas por mutaciones que producen la aparición de PTCs (mutaciones terminadoras y deleciones o inserciones que alteren la pauta de lectura). La consecuencia de estas mutaciones no va a ser la obtención de proteínas truncadas, como se podría prever, sino que la mayoría de los transcritos que porten esos PTCs van a ser degradados mediante un mecanismo denominado “Degradación mediada por proteínas terminadoras” (del inglés “*Nonsense mediated decay*”) (Maquat, 2004). Este mecanismo de supervivencia es ubicuo entre todos los eucariotas y protege del efecto deletéreo de proteínas truncadas que tuvieran un efecto negativo dominante o de ganancia de función, además de ser un proceso crítico en el desarrollo celular (Frischmeyer and Dietz, 1999). La gravedad en el fenotipo de las enfermedades causadas por mutaciones terminadoras puede predecirse por el grado de reducción de

los niveles de mRNA del alelo mutado (Dietz, et al., 1993; Hall and Thein, 1994). El NMD puede estar implicado en el control de la expresión génica regulando la estabilidad de los transcritos.

El mecanismo de NMD (figura 15) es activado por los denominados complejos de empalme de exones (del inglés “exón-junction-complex”) (EJC), que son depositados de manera natural durante el corte y empalme de exones del pre-mRNA. Normalmente, los EJC son eliminados por el ribosoma durante la primera ronda de la traducción del mRNA. Si la traducción termina a menos de 50-55 nucleótidos cadena arriba o cadena abajo de la última zona de empalme exón-exón del extremo 3', entonces los ribosomas son capaces de eliminar todos los EJC y el mRNA es inmune al NMD. Pero si existe un PTC, y la traducción termina a más de 50-55 nucleótidos cadena arriba de una zona de empalme exón-exón esto provoca que se produzca NMD (Chang, et al., 2007), excepto si el PTC se encuentra en los últimos 55 nucleótidos del penúltimo o del último exón. Disminuciones en el nivel de los transcritos se han asociado con PTCs en cáncer de mama (Perrin-Vidoz, et al., 2002), DNA polimerasa gamma (Chan, et al., 2005), etc.

En pacientes con enfermedad de McArdle, los estudios realizados han mostrado bastante heterogeneidad a nivel de mRNA. En 1983, en dos pacientes sin actividad demostrada de GPM, y en dos heterocigotos, familiares de uno de los pacientes, se determinó la presencia o ausencia de mensajero para el gen *PYGM*. No se encontró mRNA funcional en ninguno de los dos pacientes, y se observó una disminución respecto a los controles (Daegelen, et al., 1983). En un estudio con 8 pacientes mediante técnicas de Northern Blot (Gautron, et al., 1987), no se detectó mRNA para el gen *PYGM* en 5 de ellos, en los otros 3 casos se detectaron pequeñas cantidades de mRNA de tamaño correcto. Apoyando esta heterogeneidad, en otro trabajo donde se estudian cuatro pacientes mediante Northern Blot; dos de ellos mostraron niveles normales de mRNA para el gen *PYGM*, uno mostró un tamaño menor, y en otro no se detectó mRNA (Gautron, et al., 1987).

En otra serie de 11 pacientes donde se evaluó la cantidad de mRNA para el gen *PYGM* por Northern blot, se observó que en tres de ellos los niveles de mRNA eran normales (McConchie, et al., 1990). En un estudio realizado en biopsias musculares y cultivo de mioblastos de las mismas en una serie de 5 pacientes, se demostró la ausencia de mRNA para el gen *PYGM* en todos los casos (Martinuzzi, et al., 1993). En una serie de 14 pacientes italianos se observó que ocho de ellos presentaban mRNA

para el gen *PYGM*, de estos en siete los niveles estaban disminuidos y en los seis restantes no se pudo detectar mRNA (Martinuzzi, et al., 1996). Como se deduce de estos estudios, parece existir una gran heterogeneidad a nivel de mRNA.

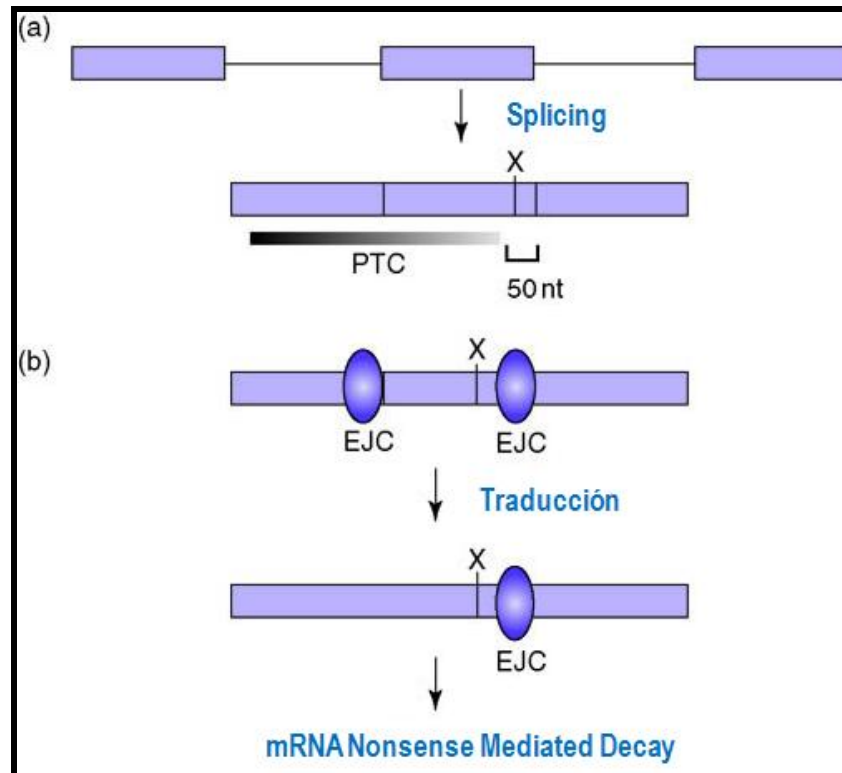


Figura 15. Mecanismo de degradación mediada por proteínas terminadoras

(a) Un PTC (X) está situado >50 nucleótidos del siguiente sitio natural de corte y empalme de exones. (b) Como consecuencia de la presencia del PTC, parte del espliceosoma bajo la forma de EJC, sigue unido al sitio de corte y empalme de exones después de eliminar los intrones. Una única ronda de traducción desplaza todos los EJC, si esto no ocurre debido a la presencia del PTC, el mRNA es degradado por el NMD. PTC; Codón prematuro de terminación, EJC; exón junctional complex, NMD; Nonsense mediated decay.

Aproximadamente el 40% de las mutaciones descritas en el gen *PYGM* (tabla 3), producen PTCs, siendo la más representativa la mutación p.R50X por ser de lejos la más prevalente, encontrándose en más del 50% de los alelos de población caucásica. Ya que las mutaciones que conllevan la presencia de PTCs pueden provocar la degradación del mRNA mediante el mecanismo de NMD, y que este tipo de mutación está muy representada en el genotipo de los enfermos de McArdle (tabla 3), es probable que este mecanismo pueda explicar la heterogeneidad existente a nivel de mRNA del gen *PYGM*, en función del tipo de mutación presente en cada paciente.

V. Sexo

En los trabajos realizados hasta la fecha con diferentes grupos de pacientes con enfermedad de McArdle, la distribución de parámetros tales como edad y sexo son similares, no observándose una mayor incidencia en función de dichos aspectos (Aquaron, et al., 2007; Bruno, et al., 2006; Deschauer, et al., 2007; Martin, et al., 2001a; Martinuzzi, et al., 2003; Servidei, et al., 1988; Vorgerd, et al., 1998).

La posible influencia del sexo como variable asociada a la heterogeneidad clínica, ha sido poco estudiada. En una serie de 24 pacientes en los que se evaluó el dolor como manifestación clínica principal (Rommel, et al., 2006), se observó que 23 de los 24 pacientes se quejaban de dolor, 15 de los anteriores lo hacían de manera intermitente y provocado por el ejercicio, y 8 pacientes mostraban dolor de manera permanente siendo en éstos el porcentaje de mujeres mayor. No se encontró correlación con otros factores como la edad, tipo de mutación, duración de la enfermedad o intensidad del dolor, tampoco se encontró correlación con el genotipo de la ECA, que se ha discutido previamente. Los autores indicaron, que podía existir un subgrupo de GSD V, donde factores genéticos relacionados con el sexo pudieran contribuir al desarrollo de síntomas crónicos como puede ser el dolor (Rommel, et al., 2006).

En un grupo de 40 pacientes con enfermedad de McArdle (21 hombres y 19 mujeres), se evaluó la asociación entre el genotipo p.R577X del gen *ACTN3*, y la capacidad de realizar ejercicio aeróbico (Lucia, et al., 2007a). Se determinaron los valores de $VO_{2\text{pico}}$ y umbral ventilatorio (VT), en la serie de pacientes y en un grupo control con las mismas características de edad y sexo que el grupo de pacientes. Se observó una menor capacidad física en las mujeres con enfermedad de McArdle que presentaban el genotipo R/R para el gen *ACTN3*, en comparación con un grupo control también con el mismo genotipo para dicho gen. Este grupo de mujeres afectas de GSD V fue clasificado en base a la escala de gravedad clínica ascendente de Martinuzzi et al (Martinuzzi, et al., 2003), observándose que el 47,4% pertenece al grupo 1, el 5,2% al grupo 2, y el 47,4% al grupo 3, ninguna de las mujeres se asignó al grupo de menor gravedad o grupo 0. En el grupo de hombres afectados con GSD V la distribución fue la siguiente: el 4,8% pertenecía al grupo 0, el 66,7% al grupo 1, el 9,5% al grupo 2, y el 19% al grupo 3. Además de una menor capacidad física, las mujeres con enfermedad de McArdle y con el genotipo R/R para el gen *ACNT3* presentaban una gravedad clínica mayor (el 80% de estas se asignó al grupo 3 o de mayor gravedad clínica) (Lucia, et al., 2007a).

En otra serie de 44 pacientes con GSD V (23 hombres y 21 mujeres), se estudió la posible asociación entre los polimorfismos de inserción/delección del gen *ACE*, y los índices de capacidad física: $VO_{2\text{pico}}$ y VT, teniendo en cuenta que el alelo I del gen *ACE* puede influir favorablemente en la capacidad física. El resultado del estudio concluye que en el grupo de mujeres con enfermedad de McArdle, la presencia del alelo I del gen *ACE*, se asocia con una mejor capacidad física en las mismas (Gomez-Gallego, et al., 2008).

La posible implicación de este factor como un posible modulador del fenotipo ha de ser pues corroborada, en estudios con un mayor tamaño muestral.

1.5.10 PRESENTACIONES ATÍPICAS

De manera general el inicio de los síntomas se produce en la infancia, y el diagnóstico se establece en la segunda o tercera década de vida. Sin embargo se han descrito varios casos de comienzo tardío de enfermedad. Donde los pacientes generalmente no han padecido ningún síntoma hasta una edad avanzada (Engel, 1963; Felice, et al., 1992; Pourmand, et al., 1983; Wolfe, et al., 2000).

Se han descrito al menos 3 casos con debut en el periodo neonatal de una forma infantil fatal de GSD V (DiMauro and Hartlage, 1978; Milstein, et al., 1989; Miranda, et al., 1979), asociados a insuficiencia respiratoria en dos casos y asfixia en otro. También se ha descrito un caso de muerte súbita de una niña de 3 meses, en la que en la autopsia se diagnosticó enfermedad de McArdle (el-Schahawi, et al., 1997).

El hecho de que el diagnóstico no sea habitual en la infancia, se puede explicar por la imposibilidad de que los niños desarrollen actividades tan vigorosas como los adultos, y por las diferencias metabólicas entre unos y otros. Aun así, se han diagnosticado varios casos en edad temprana (Ito, et al., 2003; Roubertie, et al., 1998).

También existen una serie de casos donde se observa fracaso renal agudo, sin factores precipitantes (Mittal, et al., 1995; Tabata, et al., 1986), casos con rabdomiolisis precipitada por disnea (Voduc, et al., 2004), casos precipitados farmacológicamente por el uso de estatinas (Livingstone, et al., 2004).

A todo lo anterior, hay que añadir aquellas presentaciones en las que además del déficit de miofosforilasa está presente otro problema metabólico; déficit de MADA (Rubio, et al., 2000c; Tsujino, et al., 1995a), alteraciones mitocondriales (Mancuso, et al., 2003; Rubio, et al., 1998), hipertermia maligna (Isaacs, et al., 1989), y miastenia gravis (Lucia, et al., 2007b).

2. OBJETIVOS

1. Caracterizar genético-molecularmente una amplia serie de pacientes con enfermedad de McArdle.
2. Establecer una estrategia de diagnóstico molecular en pacientes españoles con enfermedad de McArdle a partir de DNA de sangre.
3. Comprobar la patogenicidad de las nuevas mutaciones encontradas en el gen *PYGM*, en función de los siguientes criterios; *i)* conservación en la escala filogenética, *ii)* posibles alteraciones estructurales de la proteína, *iii)* ausencia en población control.
4. Clasificar los pacientes con enfermedad de McArdle en función del grado de la gravedad clínica.
5. Determinar si existe o no una posible correlación entre la mutación p.R50X y la gravedad clínica en la serie de pacientes estudiados.
6. Estudiar el posible efecto modulador de polimorfismos descritos en genes relacionados con el ejercicio y la capacidad física; *ACE*, *AMPD1*, *ACTN3*, *PPARGC1A*.
7. Estudiar la influencia del sexo y la edad en la gravedad fenotípica.
8. Evaluar el papel del mecanismo de degradación mediada por proteínas terminadoras (del inglés "Nonsense Mediated Decay") en los transcritos del gen *PYGM*, en músculo esquelético de pacientes con enfermedad McArdle, especialmente en mutaciones que producen codones de terminación prematura (PTCs).

3. RESULTADOS

3.1 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y ESTRATEGIA DIAGNÓSTICA.

Artículo 1

Rubio JC, García-Consuegra I, Nogales-Gadea G, Blázquez A, Cabello A, Lucía A, Andreu AL, Arenas J, Martín MA. ***A proposed molecular diagnostic flowchart for myophosphorylase deficiency (McArdle disease) in blood samples from Spanish patients.*** Hum Mutat. 2007 Feb;28(2):203-4.

Artículo 2

Rubio JC, Lucía A, Fernández-Cadenas I, Cabello A, Blázquez A, Gamez J, Andreu AL, Martín MA, Arenas J. ***Novel mutation in the PYGM gene resulting in McArdle disease.*** Arch Neurol. 2006 Dec;63(12):1782-4.

ARTÍCULO 1

A proposed molecular diagnostic flowchart for myophosphorylase deficiency (McArdle disease) in blood samples from Spanish patients. Hum Mutat. 2007 Feb;28(2):203-4.

Resumen

En esta publicación se presenta un análisis molecular de 55 pacientes con enfermedad de McArdle. Además se ha realizado un estudio retrospectivo a nivel molecular de una serie de 95 pacientes. El análisis de los genotipos obtenidos en este grupo de pacientes demuestra la heterogeneidad genética de la enfermedad.

En los 55 nuevos pacientes caracterizados en este trabajo se encontraron 21 mutaciones diferentes; 12 conocidas previamente y 9 nuevas mutaciones. De éstas, cinco conducen a un cambio de aminoácido (*p.I83F*, *p.G174D*, *p.A365V*, *p.R490W*, *p.Q577R*), una es una mutación terminadora (*p.C784X*), y tres producen el desplazamiento del marco de lectura que trae consigo la aparición de codones de terminación prematura. En concreto, de estas tres últimas mutaciones una se debe a la delección de un nucleótido (*p.N134KfsX161*), otra a la inserción de un nucleótido (*p.Q73HfsX7*) y otra a la duplicación de siete pares de bases (*p.R491AfsX7*). En cinco pacientes únicamente se pudo identificar uno de los alelos mutados, aunque sus biopsias musculares mostraron ausencia total de actividad de miofosforilasa.

Considerando los genotipos del total de 95 pacientes de los que consta la serie se sugiere qué: *i)* la mutación *p.R50X* es la más prevalente en población española, apareciendo en el 68,4% de los pacientes, *ii)* la mutación *p.W798R* es la segunda más frecuente (16,8%), y *iii)* la mutación *p.G205S* muestra una frecuencia del 14,7%. Estos hallazgos indican que el cribado en muestras sanguíneas de las tres mutaciones más frecuentes en población española permite caracterizar al 58,9% de los pacientes y al 74,7% de los alelos mutados. Se ha elaborado un protocolo de diagnóstico molecular en pacientes españoles con enfermedad de McArdle, que consiste en un cribado inicial de las tres mutaciones más frecuentes, seguido de la secuenciación de los exones 1, 14, 17 y 18 dónde ocurren un mayor número de mutaciones (exones “hot spot”). Con esta aproximación se puede identificar el 75,8% de los pacientes y el 85,3% de los alelos mutados, evitando por tanto en 3 de cada 4 pacientes la práctica de un método invasivo como es la biopsia muscular.

MUTATION IN BRIEF**A Proposed Molecular Diagnostic Flowchart for Myophosphorylase Deficiency (McArdle Disease) in Blood Samples from Spanish Patients**

Juan C. Rubio¹, Ines Garcia-Consuegra¹, Gisela Nogales-Gadea², Alberto Blazquez¹, Ana Cabello³, Alejandro Lucia⁴, Antoni L. Andreu², Joaquin Arenas¹, and Miguel A. Martin^{1*}

¹Centro de Investigación and ³Servicio de Neuropatología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain;

²Centre d'Investigacions en Bioquímica y Biología Molecular (CIBBIM), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ⁴Universidad Europea de Madrid, Madrid, Spain

*Correspondence to: Miguel A. Martín, Centro de Investigación. Hospital Universitario 12 de Octubre. Avda Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain; Tel.: 91-3908411; Fax: 91-3908544; E-mail: mamcasanueva@h12o.es

Grant sponsor: J.C. Rubio was supported by a contract from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) CA05/0039 Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, and M.A. Martin is supported by Programa de Intensificación de la Actividad Investigadora, ISCIII (MSC) and Agencia Laín Entralgo (Consejería de Sanidad, Comunidad de Madrid). This work was supported by grants from FIS numbers PI040487, PI041157, PI040362, PI020907 and PI050579.

Communicated by Sergio Ottolenghi

McArdle disease is a metabolic myopathy due to molecular defects in the myophosphorylase gene (*PYGM*), usually diagnosed in muscle biopsy. The aims of this study were to characterize genetically a large series of patients and to establish a protocol of molecular diagnosis on blood samples. We studied 55 Spanish unrelated patients with McArdle disease. Screening for the three more frequent mutations in the *PYGM* gene in the Spanish population (c.148C>T, p.R50X; c.613G>A, p.G205S; and c.2392T>C, p.W798R) were performed with polymerase chain-reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) methods. To identify other mutant alleles, the coding region of *PYGM* gene was sequenced. The p.R50X mutation was observed in 38 patients, the p.G205S substitution in eight, and the p.W798R change in nine. Nine novel mutations, five missense (c.247A>T, p.I83F; c.521G>A, p.G174D; c.1094C>T, p.A365V; c.1468C>T, p.R490W; and c.1730A>G, p.Q577R), one nonsense mutation (c.2352C>A, p.C784X), three frameshift (c.402del, p.N134KfsX161; c.212_218dup, p.Q73HfsX7; c.1470dup, p.R491AfsX7), and nine previously reported mutations were found. In addition, we also updated the molecular data of 95 unrelated patients with McArdle disease studied thus far in our center. Of these patients, 56 were either homozygous or compound heterozygous for the p.R50X, p.G205S, or p.W798R mutation. By including in the molecular diagnosis protocol sequencing of the exons 1, 14, 17 and 18 of the *PYGM* gene, 16 further patients were characterized, and therefore we were able to detect the molecular defect in 72 out of 95 patients. A proposed molecular diagnosis protocol of the disease based on blood DNA would avoid muscle biopsy in 75.8% [95% confidence interval (95% CI): 62.1% - 78.6%] of patients with McArdle disease. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: molecular diagnostics; McArdle disease; *PYGM*; mutation

INTRODUCTION

Genetic defects of the *PYGM* gene (MIM# 608455) cause a typical metabolic myopathy, McArdle disease or Glycogen storage disease type V (MIM# 232600), characterized by onset in the second or third decade of life, exercise intolerance, premature fatigue, myalgia, cramps in exercising muscles, and sometimes recurrent

Received 21 April 2006; accepted revised manuscript 16 August 2006.

© 2007 WILEY-LISS, INC.

DOI: 10.1002/humu.9474

myoglobinuria (Arenas et al. 2006). Brief efforts involving isometric contraction and less intense but sustained dynamic exercise are the activities more prone to cause symptoms (Dimauro and Tsujino, 1994). Most patients present a “second wind” phenomenon on exercise testing, even those not being able to report it to the clinician. It has been suggested that second wind is pathognomonic for McArdle disease (Vissing et al. 2003). Aerobic and anaerobic exercise forearm tests display no increase in lactate values (lactate flat response) (Kazemi-Stephani et al. 2002). Molecular heterogeneity has been demonstrated by the identification of various different mutations in the coding regions or splice sites of the gene (Andreu et al. 1999, Bartram et al. 1993, Bruno et al. 1999a, Bruno et al. 1999b, Bruno et al. 2006, Deschauer et al. 2003, Fernandez-Cadenas et al. 2003, Gamez et al. 1999, Kubisch et al. 1998, Martin et al. 2001a, Martin et al. 2000a, Martin et al. 2000b, Martin et al. 2001b, Quintans et al. 2004, Rubio et al. 2000a, Rubio et al. 2000b, Tsujino et al. 1994a, Tsujino et al. 1993, Tsujino et al. 1994b, Vorgerd et al. 1998). The most common among European and American patients is a nonsense mutation at codon 50 in exon 1 (p.R50X) (Andreu et al. 1998, Andreu et al. 1999, Bartram et al. 1993, Bruno et al. 2006, el-Schahawi et al. 1996, Martin et al. 2001a, Martinuzzi et al. 1996, Tsujino et al. 1993, Tsujino et al. 1995, Vorgerd et al. 1998). In this article, we present molecular studies in 55 Spanish patients with McArdle disease, and describe nine novel mutations in the *PYGM* gene. In addition, we update the molecular data of 95 patients with McArdle disease studied so far in our center and propose a molecular diagnosis protocol based on blood DNA that avoids muscle biopsy in nearly 76 % of patients.

MATERIAL AND METHODS

Patients and Controls

We studied 55 Spanish unrelated probands with McArdle disease (28 male and 27 female), ranging in age at onset from 8 to 59 years (age at diagnosis ranging from 10 to 70 years). We also studied nine McArdle’s patients who were relatives of probands. All patients presented with the typical manifestations of the disease: exercise intolerance, muscle cramps, myalgia and myoglobinuria. Eighty percent of these 64 patients experienced the “second wind phenomenon” during moderate to intense physical activities in the past. Thus, most of them have remained totally sedentary in the last years to abolish the occurrence of such unpleasant event. In all patients, resting serum creatine kinase levels were increased (range: 500 U/L to 2,800 U/L, normal < 170 U/L), and forearm ischemic exercise testing revealed no increase in venous lactate. The fifty-five index patients showed negative myophosphorylase histochemical staining in muscle biopsy, confirming the lack of the enzyme activity. In 27 out of these 55 patients, biochemical measurement of the enzyme in the biopsy material showed undetectable activity and further confirmed the diagnosis. In the remaining 28 index patients we were not able to measure myophosphorylase activity. We also updated the molecular data of 95 unrelated patients with McArdle disease [55 patients of the present study plus 40 patients documented before (Martin et al. 2001a)] studied in our center so far.

Fifty control muscle samples consisted of biopsies obtained for diagnostic purposes from individuals ultimately deemed to be free of neuromuscular diseases. We analyzed control genomic DNA from muscle or blood of 100 normal individuals.

Written consent was obtained from all individuals. The study was approved by the institutional ethics committee (Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain) and was in accordance with the Declaration of Helsinki for Human Research.

Genomic DNA Extraction and Screening for Three Known Mutations

Mutations were numbered based on protein (GenBank NP_005600.1) or cDNA sequence (GenBank NM_005609.1). The nucleotide A of the ATG translation initiation codon is the number +1, and this codon is numbered as 1.

Genomic DNA was extracted from muscle using standard methods based on Proteinase K and phenol/chloroform isolation, or from whole blood (Nucleon BACC-2, GE Healthcare Europe GmbH, Chalfont St. Giles, UK, www.gehealthcare.com).

Screening for the mutations p.R50X, p.G205S, and p.W798R were performed by PCR-RFLP using methods described elsewhere (Fernandez et al. 2000, Rubio et al. 2000a, Tsujino et al. 1993)

To avoid false positive PCR-RFLP results, we verified the nucleotide change in each mutation by direct sequencing of a second amplified PCR product. Both strands were sequenced in both directions using the conditions described below with the ABI DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A., www.appliedbiosystems.com).

PCR Amplification of Genomic DNA and Sequencing

The coding sequence of the entire PYGM gene (20 exons) was amplified by PCR from genomic DNA in 14 fragments with the primers described by Kubisch et al (Kubisch et al. 1998). In this method, intron primers are chosen so that the entire coding region, including its splice junctions, can be analyzed. For PCR analysis, 100 ng of genomic DNA was amplified with a DNA Thermocycler System (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A., www.appliedbiosystems.com) for 35 cycles consisting of denaturation at 94° C for 1 min, annealing for 1 min [temperatures as given by Kubisch et al. (Kubisch et al. 1998)], and extension at 72° C for 1 min. Initial denaturation at 94° C was performed for 4 min, and a final extension step at 72° C for 10 min stopped the program. Each 50 µl reaction contained 1.0 U Taq polymerase (BioLigne, BioLigne USA Inc, Randolph, MA, www.bioline.com), 20 pmol each primer, 200 µM each dNTP, and 1.5 mM MgCl₂ in the buffer supplied. The PCR products were purified by electrophoresis in 1 to 2% low-melting-point agarose gel and extracted from the slices by the GFX Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Europe GmbH, Chalfont St. Giles, UK, www.gehealthcare.com) according to the manufacturer's protocol and eluted in 50 µl H₂O. Approximately 200 ng of the PCR products were directly sequenced with 5 pmol of each primer with the ABI DyeDeoxy Terminator Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A., www.appliedbiosystems.com) on an ABI Prism System 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A., www.appliedbiosystems.com) according to the manufacturer's specifications. Sequences were compared with the revised genomic structure of PYGM (Kubisch et al. 1998).

Statistical Analysis

Categorical variables are reported as percentages and 95% confidence intervals (95%CI) were calculated using SPSS for Windows, ver. 11.5

RESULTS

Screening by PCR-RFLP for the three commonest mutations p.R50X, p.G205S and p.W798R in 55 McArdle's index patients showed that: i) nineteen patients were homozygous for the p.R50X mutation, two patients for the p.G205S mutation, and one patient for the p.W798R mutation, ii) three patients were compound heterozygotes for the p.R50X and p.G205S mutations, and five were compound heterozygotes for the p.R50X and p.W798R mutations, and iii) eighteen patients had one of these three mutations in one allele and an unidentified mutant allele. The alleles of the seven remaining patients did not harbor any of these three mutations.

To detect mutations other than those stated above in the unidentified alleles we amplified and sequenced genomic DNA fragments encompassing the entire coding region and intron/exon boundaries of the PYGM gene. Eighteen additional mutations were identified. Of them, nine were reported elsewhere: c.13_14del, p.L5VfsX22; (Rubio et al. 2006, in press); c.280C>T, p.R94W (Descouer et al. 2001); c.1726C>T, p.R576X (Vorgerd et al. 1998); c.1768+1G>A (Tsujino et al. 1994b); c.1804C>T, p.R602W (Martin et al. 2001a); c.1827G>A (Fernandez-Cadenas et al. 2003); c.1979C>A, p.A660D (Martin et al. 2000a); c.2111C>T, p.A704V (Martin et al. 2001a); and c.2262del, p.K754NfsX49 (Kubisch et al. 1998, Martin et al. 2001b).

Nine novel mutations were found: five missense mutations, p.I83F, p.G174D, p.A365V, p.R490W and p.Q577R; one nonsense mutation, p.C784X; one single base pair deletion, p.N134KfsX161; one seven base pair duplication, p.Q73HfsX7; and one single base pair insertion, p.R491AfsX7. It is noticeable that mutation p.A365V is derived from a c.1094C>T. In this regard, Bruno et al. (Bruno et al. 2006) have reported this nucleotide change at cDNA level, but they documented this mutation as p.A365E, that would be predicted by a c.1094C>A change. DNA from 150 control individuals did not have any of these nine mutations. PCR-RFLP analysis confirmed the existence of these novel mutations.

One mutant allele was solely identified in five patients, and their muscle biopsies showed both absence of histochemical staining and undetectable activity for myophosphorylase.

The results of the molecular analysis and distribution of mutant alleles in the 55 patients with McArdle disease are shown in Table 1.

Of the 95 patients overall studied so far by us, 56 were either homozygous or compound heterozygous for the p.R50X, p.W798R, or p.G205S mutations. By including in the molecular diagnosis protocol sequencing of the exons 1, 14, 17 and 18 of the PYGM gene, in 16 further patients the two alleles of PYGM gene were characterized, and therefore we were able to detect the molecular defect in 72 out of 95 patients (Fig. 1).

Table 1. Mutations in the *PYGM* Gene in 55 Index Patients With McArdle Disease

No. Patients	Gender (M/F)	Genotype*			
		Allele 1		Allele 2	
19	8/11	c.148C>T	p.R50X	c.148C>T	p.R50X
5	2/3	c.148C>T	p.R50X	c.2392T>C	p.W798R
3	2/1	c.148C>T	p.R50X	c.613G>A	p.G205S
3	0/3	c.148C>T	p.R50X	c.13_14del	p.L5VfsX22
2	1/1	c.613G>A	p.G205S	c.613G>A	p.G205S
2	2/0	c.148C>T	p.R50X	c.2262del	p.K754NfsX49
2	0/2	c.2392T>C	p.W798R	c. ?	p.?
1	1/0	c.2392T>C	p.W798R	c.2392T>C	p.W798R
1	1/0	c.613G>A	p.G205S	c.1768+1G>A	-----
1	1/0	c.2392T>C	p.W798R	c.1468C>T	p.R490W
1	1/0	c.148C>T	p.R50X	c.280C>T	p.R94W
1	0/1	c.148C>T	p.R50X	c.212_218dup	p.Q73HfsX7
1	0/1	c.148C>T	p.R50X	c.1804C>T	p.R602W
1	1/0	c.148C>T	p.R50X	c.1979C>A	p.A660D
1	1/0	c.148C>T	p.R50X	c.1726C>T	p.R576X
1	1/0	c.148C>T	p.R50X	c.1094C>T	p.A365V
1	1/0	c.613G>A	p.G205S	c.247A>T	p.I83F
1	0/1	c.2111C>T	p.A704V	c.2111C>T	p.A704V
1	1/0	c.521G>A	p.G174D	c.1827G>A	-----
1	0/1	c.1827G>A	-----	c.1827G>A	-----
1	0/1	c.402del	p.N134KfsX161	c.1470dup	p.R491AfsX7
1	1/0	c.1730A>G	p.Q577R	c.1979C>A	p.A660D
1	1/0	c.2352C>A	p.C784X	c.280C>T	p.R94W
1	1/0	c.148C>T	p.R50X	c.?	p. ?
1	1/0	c.613G>A	p.G205S	c. ?	p.?
1	0/1	c.13_14del	p.L5VfsX22	c. ?	p.?

Novel mutations described in this study are shown in bold.

M, male; F, female; Reference GenBank sequences used were NP_005600.1 for protein and NM_005609.1 for cDNA. The nucleotide A of the ATG translation initiation codon is the number +1, and this codon is numbered as 1.

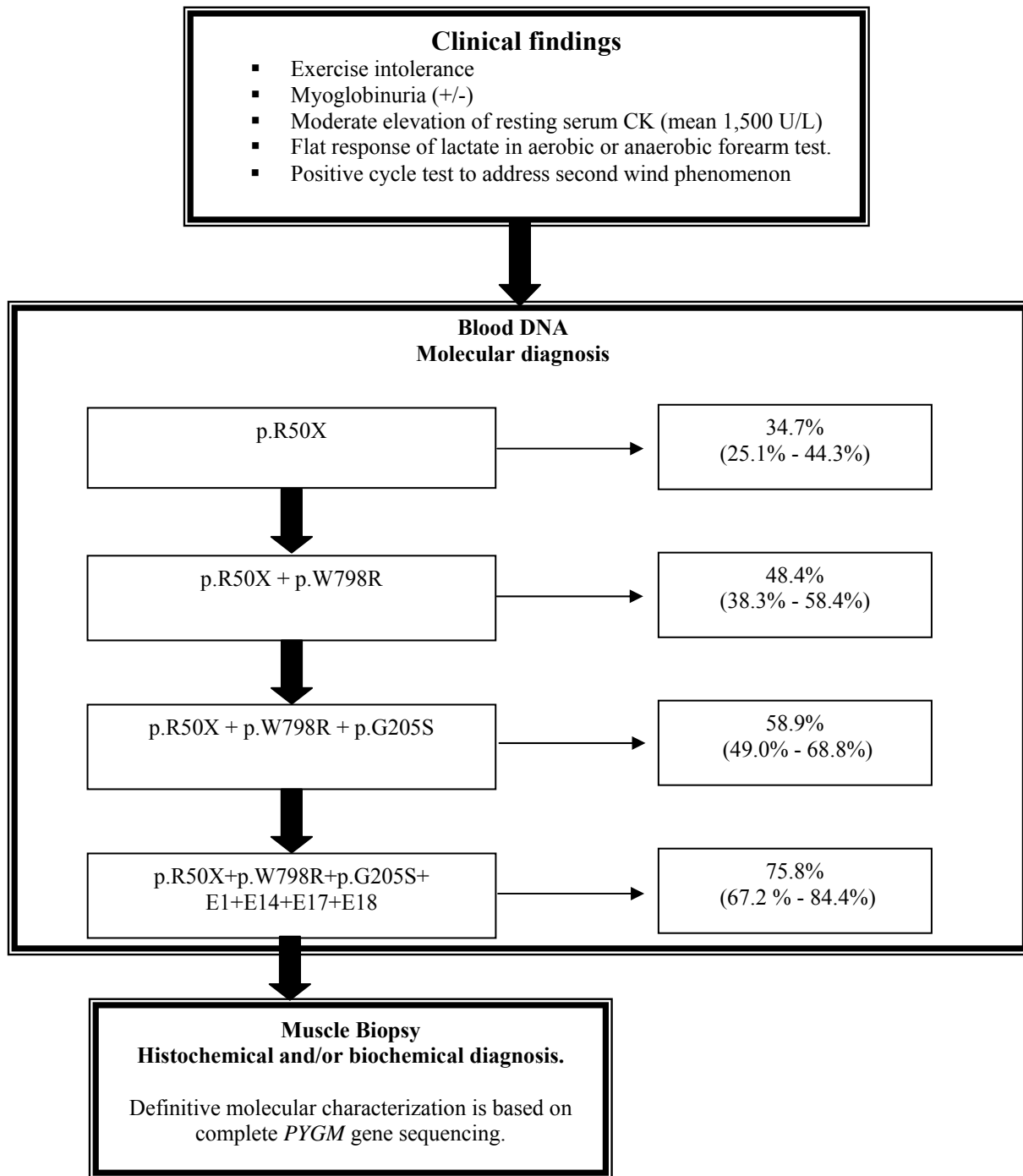


Figure 1 . Proposed diagnostic flow chart for diagnosis of McArdle disease. (+/-) indicates presence or absence of the particular clinical feature. In the Blood DNA molecular diagnosis square, left boxes indicate the mutations and exons screened, left flow chart (thick arrow-lines) shows each of the consecutive steps of molecular screening, and right boxes represent the percentage (95% confidence interval) of patients in whom the two mutant alleles were identified by using the corresponding consecutive step of molecular screening (horizontal thin arrow-lines). E: exon.

DISCUSSION

We have identified nine novel molecular genetic defects in Spanish patients with McArdle disease: five missense mutations, one nonsense mutation, and three frameshift mutations. The p.A365V missense mutation disrupts a highly conserved buried site localized near various residues involved in glycogen storage (Hudson et al. 1993). The p.G174D missense mutation modifies a buried conserved site that lies close to two clusters of amino acid residues that are important in dimerization (Hudson et al. 1993). The p.R490W missense mutation alters a buried conserved site that lies next to a pyridoxal-5'-phosphate (PLP) binding site (Hudson et al. 1993). The p.I83F mutation disrupts a conserved buried site that resides in a fragment of the protein important for dimerization and, binding to PLP and AMP (Hudson et al. 1993). The p.Q577R missense mutation modifies a strictly conserved buried site that is located in clusters of amino acid residues that are related to active site, glucose-binding, PLP-binding, and purine nucleoside-inhibitor sites (Hudson et al. 1993). Therefore, these missense mutations would presumably affect protein sites that are important for the enzyme activity. In addition, they are likely to be the cause of myophosphorylase deficiency, because (a) they were the only nucleotide alteration in the coding region and adjacent exon/intron boundaries of the *PYGM* gene; (b) they lead to the replacement of amino acid residues that are identical not only in the glycogen phosphorylase of various species but also in the three human isoforms of this enzyme (Hudson et al. 1993) which is consistent with a crucial role of these amino acids in the normal function of myophosphorylase; and 100 normal controls and 50 disease controls did not have any of these mutations in their alleles.

The p.C784X mutation is likely to cause premature termination of translation and to generate a truncated 783-amino acid peptide instead of the normal 842-residue myophosphorylase protein. The p.N134KfsX161 mutation predicts a frameshift with premature termination of the protein 161 amino acids downstream from the mutation; the p.Q73HfsX7 mutation predicts a frameshift with premature termination of the protein seven amino acids downstream from the mutation; and the p.R491AfsX7 mutation also predicts a frameshift and premature termination of translation seven codons downstream from the mutation. In these four mutations, the difference in length of the resulting peptides is expected to be crucial for myophosphorylase function. The abnormal enzyme proteins may be more prone to degradation and the resulting enzymes are missing substantial and relevant parts of the total protein. The fact that these four mutations were absent in 150 controls further supports their pathogenicity.

We also identified nine mutations already described. The mutation c.1768 +1G>A has been reported in patients from different ethnic background (Martin et al. 2001b, Tsujino et al. 1994b). In this regard, the mutations p.R94W and p.R576X identified in two patients, were previously described in McArdle disease patients of German origin (Deschauer et al. 2003, Vorgerd et al. 1998) suggesting that these mutations are not private, and might be found in individuals from other ethnic backgrounds. The p.K754NfsX49, p.A660D, p.R602W, p.A704V, c.1827G>A and p.L5VfsX22 mutations have already been reported in Spanish patients with McArdle disease (Fernandez-Cadenas et al. 2003, Gamez et al. 1999, Martin et al. 2001a, Martin et al. 2001b, Rubio et al. 2006, in press).

In this series of 55 patients, the p.R50X mutation was observed in 39 patients and 58 alleles, the G205S mutation in 8 patients and 10 alleles, and the p.W798R substitution in 9 patients and 10 alleles.

In five patients only one mutant allele was identified. These patients are presumably manifesting heterozygotes, (Dimauro and Tsujino, 1994). Although residual activity of the enzyme in muscle was expected to be found, we failed to detect it. In this regard, the presence of mutations in non-sequenced intronic or regulatory regions of the *PYGM* gene cannot be excluded. Molecular studies based on RNA rather than DNA analysis could shed light to this issue (Fernandez-Cadenas, et al. 2003), but we must keep in mind that human muscle specimen is mandatory, and this sample is not always available.

Taken together these molecular data on 55 patients with those reported by us before on 40 unrelated patients (Martin et al. 2001a), we have studied thus far 95 Spanish patients with McArdle disease. The p.R50X mutation is the commonest in Spanish patients, accounting for 68.4% (95%CI: 59.1%–77.7%) of patients (65 out of 95) and 51.6% (95%CI: 44.5%–58.7%) of alleles (98 out of 190). The p.W798R is second most frequent underlying cause of myophosphorylase deficiency representing 16.8% (95%CI: 9.28%–24.3%) of patients (16 out of 95) and 11.6% (95%CI: 7.05%–16.2%) of alleles (22 out of 190). The p.G205S accounts for 14.7% (95%CI: 7.56%–21.8%) of patients (14 out of 95) and 11.6% (95%CI: 7.05%–16.2%) of alleles (22 out of 190). Our data overall indicate that blood DNA analysis based on PCR-RFLP methods in patients with clinical suspicion of McArdle disease (Figure 1) could detect as much as 56 of patients (58.9%; 95% CI: 49.0%–68.8%) and 142 of mutant alleles (74.7%; 95%CI: 68.5%–80.9%). Therefore, we propose to screen in blood for: first the p.R50X, second the p.W798R, and third, the p.G205S mutations (Figure 1). To increase the sensitivity of the molecular diagnosis in blood, and as a

second line of screening, we propose to sequence the exons 1, 14, 17 and 18, because by doing so we were able to identify molecularly 16 additional patients in this cohort (Figs. 1 and 2, Table 1). This second line of sequencing analysis is an additional effort that yields a moderate but significant diagnostic improvement. Every center should evaluate whether this strategy is adequate and if it is really worth implementing it. This way, we could avoid an invasive muscle biopsy in as much as 72 patients with McArdle disease [(75.8% of patients; 95%CI: 67.2%-84.4%) and (85.3%; 95%CI: 80.3%-90.3% of alleles)]. In the remaining percentage of patients who were not characterized using blood DNA, a muscle biopsy should be obtained to establish either the diagnosis of McArdle disease or other muscle glycogenoses also giving a flat lactate response in ischemic forearm testing (Figure 1). Given that the W798R mutation is only present in Spaniards, this flowchart is not useful for other populations (Arenas et al. 2006).

Moreover, our data further confirm the genetic heterogeneity of Spanish patients with McArdle disease and expand the crowded map of mutations (Fig. 2) within *PYGM* gene.

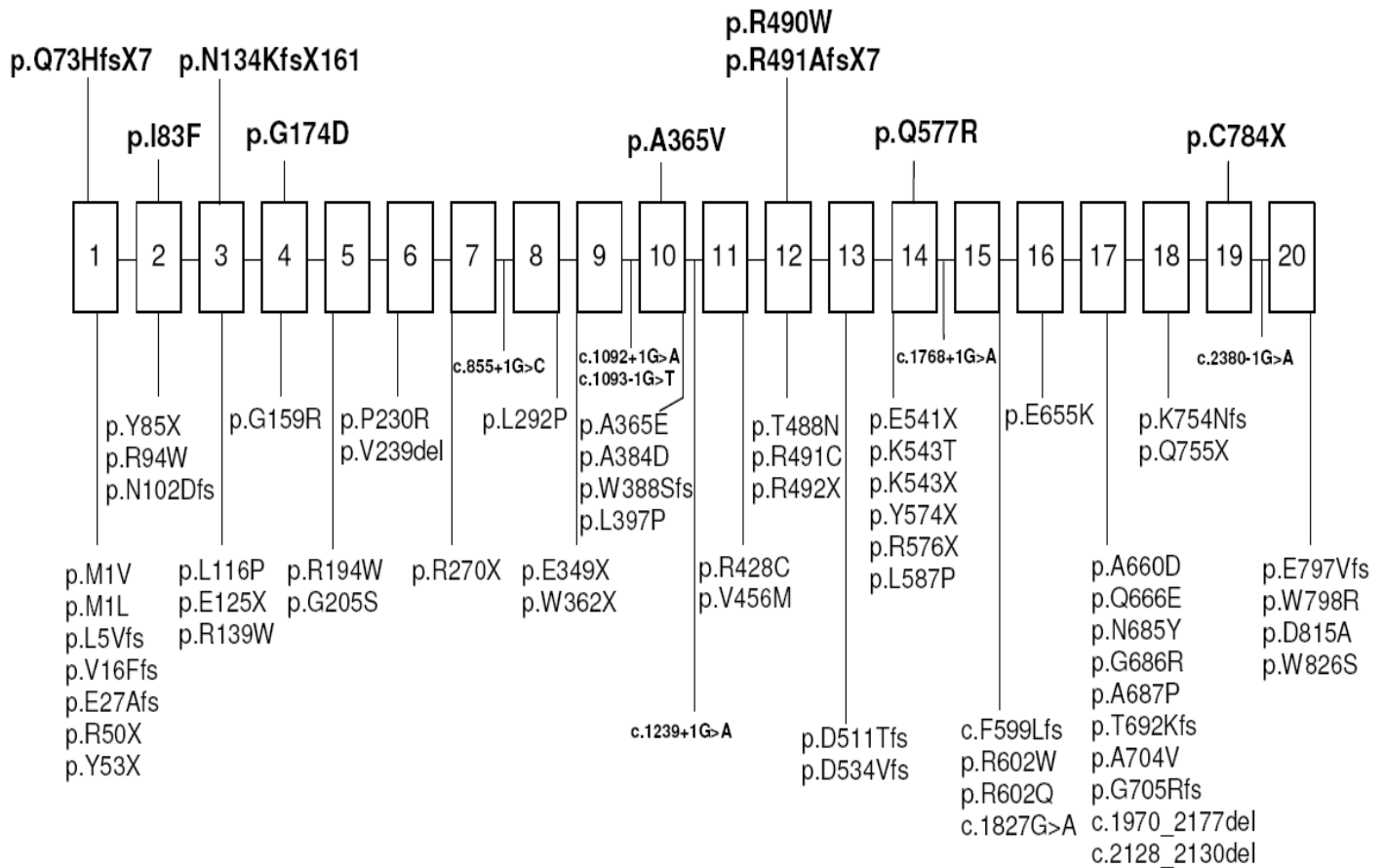


Figure 2. Map of the mutations in the *PYGM* gene in patients with McArdle disease. Open boxes represent the 20 exons of the *PYGM* gene. Novel mutations identified in this study are above the gene map.

REFERENCES

- Andreu AL, Bruno C, Gamez J, Shanske S, Cervera C, Navarro C, Arbos MA, Tamburino L, Schwartz S, DiMauro S. 1998. Molecular genetic analysis of McArdle disease in Spanish patients. *Neurology* 51:260-262.
- Andreu AL, Bruno C, Tamburino L, Gamez J, Shanske S, Cervera C, Navarro C, DiMauro S. 1999. A new mutation in the myophosphorylase gene (Asn684Tyr) in a Spanish patient with McArdle disease. *Neuromuscul Disord* 9:171-173.
- Arenas J, Martin MA, Andreu AL. 2006. Glycogen Storage Disease Type V. In: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource [database online]. Copyright, University of Washington, Seattle, 1997-2006. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed 2006, June 15th.
- Bartram C, Edwards RH, Clague J, Beynon RJ. 1993. McArdle disease: a nonsense mutation in exon 1 of the muscle glycogen phosphorylase gene explains some but not all cases. *Hum Mol Genet* 2:1291-1293.
- Bruno C, Cassandrini D, Martinuzzi A, Toscano A, Moggio M, Morandi L, Servadei S, Mongini T, Angelini C, Musumeci O, Comi GP, Lamperti C, Filosto M, Zara F, Minetti C. 2006. McArdle disease: the mutation spectrum of PYGM in a large Italian cohort. *Hum Mutat.* 27:718.
- Bruno C, Lofberg M, Tamburino L, Jankala H, Hadjigeorgiou GM, Andreu AL, Shanske S, Somer H, DiMauro S. 1999a. Molecular characterization of McArdle's disease in two large Finnish families. *J Neurol Sci* 165:121-125.
- Bruno C, Tamburino L, Kawashima N, Andreu AL, Shanske S, Hadjigeorgiou GM, Kawashima A, DiMauro S. 1999b. A nonsense mutation in the myophosphorylase gene in a Japanese family with McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 9:34-37.
- Deschauer M, Hertel K, Zierz S. 2003. Two novel mutations in the myophosphorylase gene in a patient with McArdle disease. *Muscle Nerve* 27:105-107.
- Deschauer M, Opalka JR, Lindner A, Zierz S. 2001. A novel nonsense mutation (R269X) in the myophosphorylase gene in a patient with McArdle disease. *Mol Genet Metab* 74:489-491.
- DiMauro S, Tsujino S. 1994. Non-lysosomal glycogenoses. In: Engel AG F-AC, editor. *Myology*. New York: McGraw-Hill. p 1554-1576.
- El-Schahawi M, Tsujino S, Shanske S, DiMauro S. 1996. Diagnosis of McArdle's disease by molecular genetic analysis of blood. *Neurology* 47:579-580.
- Fernandez R, Navarro C, Andreu AL, Bruno C, Shanske S, Gamez J, Teixeira S, Hernandez I, Tejero A, Fernandez JM, Cabello A, Campos Y, Cervera C, Culebras JM, Andreu AL, Fletterick R, Arenas J. 2000. A novel missense mutation (W797R) in the myophosphorylase gene in Spanish patients with McArdle disease. *Arch Neurol* 57:217-219.
- Fernandez-Cadenas I, Andreu AL, Gamez J, Gonzalo R, Martin MA, Rubio JC, Arenas J. 2003. Splicing mosaic of the myophosphorylase gene due to a silent mutation in McArdle disease. *Neurology* 61:1432-1434.
- Gamez J, Fernandez R, Bruno C, Andreu AL, Cervera C, Navarro C, Schwartz S, DiMauro S. 1999. A new mutation in the regulatory domain of the myophosphorylase gene affecting protein dimer contact. *Muscle Nerve* 22:1136-1138.
- Hudson JW, Golding GB, Crerar MM. 1993. Evolution of allosteric control in glycogen phosphorylase. *J Mol Biol* 234:700-721.
- Kazemi-Esfarjani P, Skomrowska E, Jensen TD, Haller RG, Vissing J. 2002. A nonischemic forearm exercise test for McArdle disease. *Ann Neurol* 52:153-159.
- Kubisch C, Wicklein EM, Jentsch TJ. 1998. Molecular diagnosis of McArdle disease: revised genomic structure of the myophosphorylase gene and identification of a novel mutation. *Hum Mutat* 12:27-32.
- Martin MA, Rubio JC, Buchbinder J, Fernandez-Hojas R, del Hoyo P, Teixeira S, Gamez J, Navarro C, Fernandez JM, Cabello A, Campos Y, Cervera C, Culebras JM, Andreu AL, Fletterick R, Arenas J. 2001a. Molecular heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease): a genotype-phenotype correlation study. *Ann Neurol* 50:574-581.
- Martin MA, Rubio JC, Campos Y, Rico y JR, Cabello A, Arenas J. 2000a. A homozygous missense mutation (A 659D) in the myophosphorylase gene in a Spanish patient with McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 10:447-449.

- Martin MA, Rubio JC, Campos Y, Vilchez J, Cabello A, Arenas J. 2000b. Two homozygous mutations (R193W and 794/795 delAA) in the myophosphorylase gene in a patient with McArdle's disease. *Hum Mutat* 15:294.
- Martin MA, Rubio JC, Garcia A, Fernandez MA, Campos Y, Krawczak M, Cooper DN, Arenas J. 2001b. Resolution of a mispaired secondary structure intermediate could account for a novel micro-insertion/deletion (387 insA/del 8 bp) in the *PYGM* gene causing McArdle's disease. *Clin Genet* 59:48-51.
- Martinuzzi A, Tsujino S, Vergani L, Schievano G, Cadaldini M, Bartoloni L, Fanin M, Siciliano G, Shanske S, DiMauro S, Angelini C. 1996. Molecular characterization of myophosphorylase deficiency in a group of patients from northern Italy. *J Neurol Sci* 137:14-19.
- Quintans B, Sanchez-Andrade A, Teixeira S, Fernandez-Hojas R, Rivas E, Lopez MJ, Navarro C. 2004. A new rare mutation (691delCC/insAAA) in exon 17 of the *PYGM* gene causing McArdle disease. *Arch Neurol* 61:1108-1110.
- Rubio JC, Lucia A, Fernandez-Cadenas I, Cabello A, Blazquez A, Gamez J, Andreu AL, Martin MA, Arenas J. 2006. A novel mutation in the *PYGM* gene resulting in McArdle's disease. *Arch Neurol*, in press.
- Rubio JC, Martin MA, Campos Y, Auciello R, Cabello A, Arenas J. 2000a. A missense mutation W797R in the myophosphorylase gene in a Spanish patient with McArdle's disease. *Muscle Nerve* 23:129-131.
- Rubio JC, Martin MA, Campos Y, Cabello A, Arenas J. 2000b. A missense mutation T487N in the myophosphorylase gene in a Spanish patient with McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 10:138-140.
- Tsujino S, Rubin LA, Shanske S, DiMauro S. 1994a. An A-to-C substitution involving the translation initiation codon in a patient with myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *Hum Mutat* 4:73-75.
- Tsujino S, Shanske S, DiMauro S. 1993. Molecular genetic heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *N Engl J Med* 329:241-245.
- Tsujino S, Shanske S, Nonaka I, DiMauro S. 1995. The molecular genetic basis of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *Muscle Nerve* 3:S23-S27.
- Tsujino S, Shanske S, Nonaka I, Eto Y, Mendell JR, Fenichel GM, DiMauro S. 1994b. Three new mutations in patients with myophosphorylase deficiency (McArdle disease). *Am J Hum Genet* 54:44-52.
- Vissing J, Haller RG. 2003. A diagnostic cycle test for McArdle's disease. *Ann Neurol* 54:539-542.
- Vorgerd M, Kubisch C, Burwinkel B, Reichmann H, Mortier W, Tettenborn B, Pongratz D, Lindemuth R, Tegenthoff M, Malin JP, Manfred WK. 1998. Mutation analysis in myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *Ann Neurol* 43:326-331.

ARTÍCULO 2

Novel mutation in the *PYGM* gene resulting in McArdle disease. Arch Neurol. 2006 Dec;63(12):1782-4.

Resumen

En esta publicación se describe una nueva mutación (*p.L5VfsX22*) en tres pacientes no relacionados entre sí con enfermedad de McArdle. Todos resultaron heterocigotos compuestos con la mutación terminadora, *p.R50X*.

En uno de los pacientes (mujer de 31 años) se evaluó funcionalmente la capacidad física mediante una prueba de tolerancia al ejercicio realizada en un cicloergómetro. Para prevenir la aparición de mioglobinuria durante la prueba se administraron a la paciente 75 gramos de sacarosa 30 minutos antes de la realización de la misma. El objetivo fue determinar el valor de VO_{2pico} , monitorizando en todo momento el ritmo cardíaco y tomando muestras sanguíneas para valorar lactato y amonio cada 2 minutos. El resultado del estudio mostró un valor de VO_{2pico} de $20 \text{ mL.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ que está en consonancia con los valores de VO_{2pico} obtenidos en otros pacientes con enfermedad de McArdle que han sido tratados con sacarosa antes de realizar la prueba. El resultado además refleja la notable intolerancia al ejercicio de la paciente.

Novel Mutation in the PYGM Gene Resulting in McArdle Disease

Juan C. Rubio, MSc; Alejandro Lucia, MD, PhD; Israel Fernández-Cadenas, MSc; Ana Cabello, MD, PhD; Alberto Blázquez, MSc; Josep Gámez, MD, PhD; Antoni L. Andreu, PhD; Miguel A. Martín, PhD; Joaquín Arenas, PhD

Background: McArdle disease is a common metabolic disorder characterized by marked exercise intolerance, premature fatigue during exertion, myalgia, and cramps. Despite the wide knowledge of the molecular basis of McArdle disease, few studies have used a physiological approach or explored the possibility of improving the exercise capacity of these patients.

Objectives: To describe 3 unrelated patients with McArdle disease with a novel mutation in the PYGM gene and to assess the physical capacity in 1 of them.

Design: Using molecular genetic approaches, we identified the underlying molecular defect in 3 patients with McArdle disease. Physical performance was evaluated in 1 patient by means of an exercise tolerance test on a bicycle ergometer.

Setting: Two university hospitals. Exercise physiology studies were performed in a university department.

Patients: The 3 patients showed common features of McArdle disease. They were definitively diagnosed by histochemistry, biochemistry, or molecular genetic analysis.

Results: All of the 3 patients were genetic compounds for the common Arg50Stop mutation and a novel c.13_14delCT mutation in the PYGM gene. The peak oxygen uptake (VO_{2peak}) of the patient who performed the exercise test was only $20.2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Conclusions: Together with the novel mutation, there is a markedly decreased exercise capacity in a patient with McArdle disease, which could account for the profound alteration in the capacity for performing normal activities of daily living in this subpopulation.

Arch Neurol. 2006;63:1782-1784

Author Affiliations: Centro de Investigación (Messrs Rubio and Blázquez and Drs Martín and Arenas) and Servicio de Neuropatología (Dr Cabello), Hospital Universitario 12 de Octubre, and Universidad Europea de Madrid (Dr Lucia), Madrid, Spain; and Centre d'Investigacions en Bioquímica y Biología Molecular (Mr Fernández-Cadenas and Dr Andreu) and Servicio de Neurología (Dr Gámez), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

HUMAN MUSCLE GLYCOgen phosphorylase deficiency (McArdle disease) is a common metabolic disorder characterized by marked exercise intolerance, premature fatigue during exertion, myalgia, and cramps.¹ Molecular heterogeneity of the disease was demonstrated by the identification of different mutations in the PYGM gene.² The most common mutations among Spanish patients are the Arg50Stop and Trp798Arg mutations.³

Despite the wide knowledge of the molecular basis of McArdle disease, few studies have used a physiological approach or explored the possibility of improving the exercise capacity of these patients. In this regard, Vissing and Haller⁴ found that oral sucrose ingested before exercise alleviates the muscle symptoms and abolishes the second-wind

phenomenon that occurs during the early stages of exercise, when patients are prone to muscle injury.

In this article, we describe a novel c.13_14delCT mutation in 3 unrelated patients with McArdle disease. We also describe decreased peak oxygen uptake (VO_{2peak}) in 1 of them, which reflects the intolerance to virtually all types of exercise.

METHODS

PATIENTS

The 3 patients showed the clear-cut pattern of McArdle disease: lifelong exercise intolerance, myoglobinuria, and muscle pain and cramps during and following exercise. In 2 patients, muscle histochemistry showed a myophosphorylase deficiency and biochemistry showed a lack of enzyme activity. The third patient was diagnosed by molecular genetic analysis.

MOLECULAR GENETIC STUDIES

The DNA was drawn from muscle in 2 patients and from blood in 1 patient. The coding sequence of the entire *PYGM* gene (20 exons) was amplified by polymerase chain reaction and sequenced as described.^{5,6} To confirm the presence of the novel mutation in the 3 patients, we used polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis (**Figure**).

EXERCISE TOLERANCE TEST ON BICYCLE ERGOMETER

Only 1 patient (a 31-year-old woman) agreed to undergo the exercise test that is described later. After she was informed in detail of the possible discomfort associated with the exercise protocol (leg pain, feeling of tachycardia, breathlessness, and dizziness), she gave her written consent to performing the test. She was eligible to perform the test, as she had reported no history of exercise-induced pigmenturia in the last 5 years. The study was approved by the institutional ethics committee (Universidad Europea de Madrid, Madrid, Spain) and was in accordance with the Declaration of Helsinki for Human Research.

She came to the laboratory at 9 AM after an overnight fast and performed a graded test until volitional exhaustion (workload increases of 10 W/min, starting at 10 W). For ethical and medical reasons, ie, to prevent the occurrence of muscle cramps and exercise-induced myoglobinuria,⁴ the exercise test was preceded by the ingestion (30 minutes prior to exercise) of a 660-mL solution containing 75 g of sucrose that was in turn followed by a 15-minute warm-up period (cycle-ergometer pedaling at 10 W). Gas exchange data were collected continuously with an automated breath-by-breath system (Vmax 29C; Sensor-Medics, Yorba Linda, Calif) to determine the $\text{VO}_{2\text{peak}}$.

Heart rates (beats per minute) were also continuously monitored during the test using 12-lead electrocardiographic tracings. Capillary blood samples for the measurement of lactate, glucose (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, Ohio), and ammonia (Menarini Diagnostics, Barcelona, Spain) concentrations were obtained from fingertip pricks every 2 minutes during the test.

RESULTS

Sequencing of the *PYGM* gene showed the presence of the Arg50Stop mutation and a novel c.13_14delCT mutation in exon 1 in all of the 3 patients. Results were confirmed by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis (Figure). The novel c.13_14delCT mutation presumably causes a frameshift and a premature termination of translation 21 amino acids downstream from the rearrangement.

In the patient who underwent the exercise test, the blood glucose levels were consistently higher than 5.6 mmol/L (100 mg/dL) during exercise. The postexercise creatine kinase level did not exceed 400 IU/L (the reference maximum limit in our laboratory is 170 IU/L). The patient tolerated the exercise relatively well and did not report muscle cramps during the tests. However, she did have overall muscle fatigue and discomfort in both the neck and shoulder muscles due to the cycling position.

The patient's $\text{VO}_{2\text{peak}}$ reached during the graded test was $20.2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ whereas her heart rate consistently increased from the start of exercise to reach a maximum value of 157 beats/min. The lactate concentration

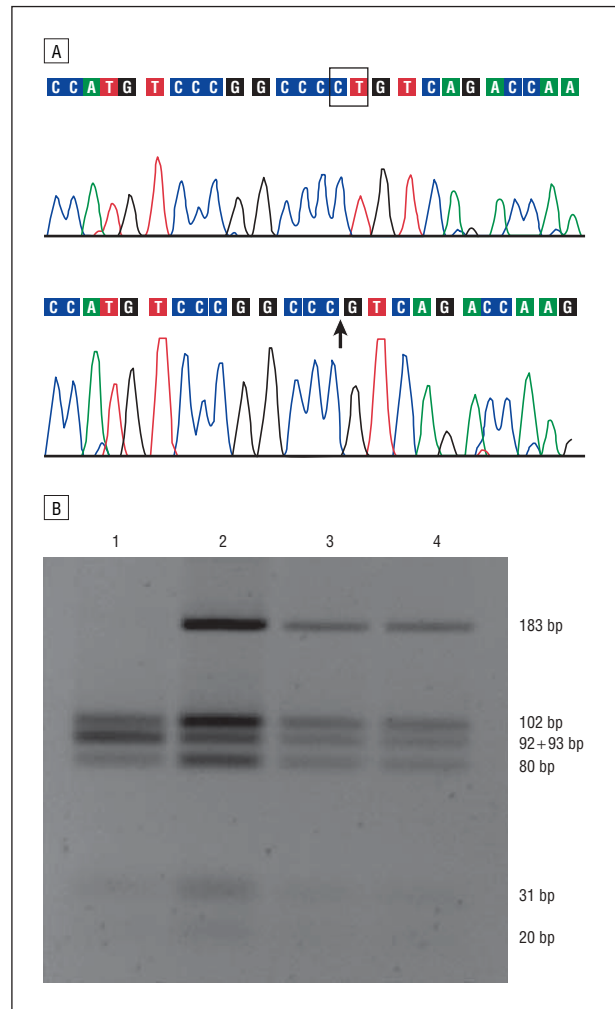


Figure. Sequencing (A) and polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (B) analyses of the novel c.13_14delCT mutation in the *PYGM* gene. A, The complementary DNA sequences of wild-type (top) and mutant (bottom) alleles in exon 1 of the *PYGM* gene are shown. Open rectangle indicates deleted dinucleotide in the wild-type allele; arrow, deleted dinucleotide in the mutant; C, cytosine; A, adenine; T, thymine; G, guanine. B, The agarose gel shows the results of the polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis. Lane 1 shows DNA from a normal control; lanes 2 through 4, DNA from the 3 patients. An amplified DNA fragment of 418 base pairs (bp) was digested with *Mva*I (with 5 restriction sites). In the normal allele, 2 informative bands of 92 bp and 93 bp are generated whereas in the mutant allele, 1 restriction site is abolished, yielding a fragment of 183 bp.

at baseline (before glucose administration) was 1.0 mmol/L, ie, similar to the values reported for patients with McArdle disease under the same conditions,⁴ and consistently increased thereafter to reach a peak value of 2.6 mmol/L, which evidenced the occurrence of glucose-based energy production. The peak ammonia level was 231 $\mu\text{mol/L}$ (324 $\mu\text{g/dL}$).

COMMENT

Our patients had clinical, morphological, and biochemical evidence of McArdle disease. This led us to study the *PYGM* gene, and molecular analysis revealed that the 3 patients were compound heterozygous for the common Arg50Stop mutation (changing an arginine residue for a

stop codon) and a novel c.13_14delCT mutation in exon 1. The latter mutation causes a frameshift and premature termination of translation 820 amino acids before the end of the PYGM protein. The resulting shorter protein of 21 amino acids is likely nonfunctional, unstable, and rapidly degraded.

The Arg50Stop mutation is the most common alteration in the PYGM gene in Spanish patients with McArdle disease,³ accounting for 70.0% of patients. Rearrangements are much less frequent, as they represent only 7.4% of patients.³ Taken together our previous data³ with results shown here, the novel c.13_14delCT mutation represents 1 of the most usual rearrangements in Spanish patients, accounting for 3.5% of patients and 23.0% of rearrangements. Despite the facts that sucrose was administered to the patient 30 minutes before exercise with subsequent enhanced glycolytic flux (and thus an increased rate of total energy production in working muscles) as evidenced by consistently increasing lactate levels during the graded test and that the patient reported subjectively improved exercise tolerance following sucrose ingestion, the $\text{VO}_{2\text{peak}}$ of the patient was still low and similar to those values (approximately $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) previously reported after glucose administration in patients of similar age (men and women) with McArdle disease and carriers of the most common Arg50Stop and/or Gly205Ser mutations.⁷ This is an important finding, as $\text{VO}_{2\text{peak}}$ is an integrative indicator that reflects the maximum capacity of different organ systems—lungs, heart, blood, working skeletal muscles—involved in the chain from the delivery of atmospheric oxygen to the mitochondria⁸ and is also a powerful, independent predictor of health status and mortality in both healthy persons and those with disease.⁹ The patient's $\text{VO}_{2\text{peak}}$ was, however, higher than those values (approximately $15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) reported for patients with McArdle disease not receiving previous glucose administration and thus having blocked glycolysis.¹⁰

Accepted for Publication: February 28, 2006.

Correspondence: Miguel A. Martín, PhD, Centro de Investigación, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avda Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain (mamcasanueva@h12o.es).

Author Contributions: Dr Martín had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the

integrity of the data and the accuracy of the data analysis. **Study concept and design:** Rubio, Lucia, Andreu, Martín, and Arenas. **Acquisition of data:** Rubio, Lucia, Fernández-Cadenas, Cabello, Blázquez, Gámez, and Martín. **Analysis and interpretation of data:** Rubio, Lucia, Fernández-Cadenas, Cabello, Blázquez, Andreu, Martín, and Arenas. **Drafting of the manuscript:** Rubio, Lucia, Fernández-Cadenas, Cabello, Blázquez, Gámez, Martín, and Arenas. **Critical revision of the manuscript for important intellectual content:** Lucia, Andreu, Martín, and Arenas. **Obtained funding:** Lucia, Andreu, Martín, and Arenas. **Financial Disclosure:** None reported.

Funding/Support: This work was supported by grants P1040487, P1041157, P1040362, and P1050579 from Fondo de Investigación Sanitaria and by grant CAM/GR/SAL/0351/2004 from Comunidad de Madrid, Consejería de Educación, Madrid, Spain. Mr Rubio was supported by contract CA05/0039 and Mr Blázquez by grant CM03000 from Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.

REFERENCES

1. McArdle B. Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown. *Clin Sci*. 1951;10:13-33.
2. Tsujino S, Shanske S, DiMauro S. Molecular genetic heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle disease). *N Engl J Med*. 1993;329:241-245.
3. Martín MA, Rubio JC, Buchbinder J, et al. Molecular heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease): a genotype-phenotype correlation study. *Ann Neurol*. 2001;50:574-581.
4. Vissing J, Haller RG. The effect of oral sucrose on exercise tolerance in patients with McArdle's disease. *N Engl J Med*. 2003;349:2503-2509.
5. Kubisch C, Wicklein EM, Jentsch TJ. Molecular diagnosis of McArdle disease: revised genomic structure of the myophosphorylase gene and identification of a novel mutation. *Hum Mutat*. 1998;12:27-32.
6. Fernandez-Cadenas I, Andreu AL, Gamez J, et al. Splicing mosaic of the myophosphorylase gene due to a silent mutation in McArdle disease. *Neurology*. 2003;61:1432-1434.
7. Haller RG, Vissing J. Spontaneous "second wind" and glucose-induced "second wind" in McArdle disease: oxidative mechanisms. *Arch Neurol*. 2002;59:1395-1402.
8. Day JR, Rossiter HB, Coats EM, Skasick A, Whipp BJ. The maximally attainable VO_2 during exercise in humans: the peak vs maximum issue. *J Appl Physiol*. 2003;95:1901-1907.
9. Myers J, Prakash M, Froelicher V, Do D, Partington S, Atwood JE. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med*. 2002;346:793-801.
10. Hagberg JM, King DS, Rogers MA, et al. Exercise and recovery ventilatory and VO_2 responses of patients with McArdle's disease. *J Appl Physiol*. 1990;68:1393-1398.

Announcement

Sign Up for Alerts—It's Free! Archives of Neurology offers the ability to automatically receive the table of contents of ARCHIVES when it is published online. This also allows you to link to individual articles and view the abstract. It makes keeping up-to-date even easier! Go to <http://pubs.ama-assn.org/misc/alerts.dtl> to sign up for this free service.

3.2 HETEROGENEIDAD CLÍNICA. VARIABLES MODIFICADORAS DEL FENOTIPO CLÍNICO

Artículo 3

Rubio JC, Gomez-Gallego F, Santiago C, Garcia-Consuegra I, Perez M, Barriopedro MI, Andreu AL, Martin MA, Arenas J, Lucia A. ***Genotype modulators of clinical severity in McArdle disease.*** Neurosci Lett. 2007 Jul 18;422(3):217-22. Epub 2007 Jun 21.

Artículo 4

Rubio JC, Perez M, Mate-Munoz JL, Garcia-Consuegra I, Chamorro-Vina C, Fernandez del Valle M, Andreu AL, Martin MA, Arenas J, Lucia A. ***AMPD1 genotypes and exercise capacity in McArdle patients.*** Int J Sports Med. 2008 Apr;29(4):331-5. Epub 2007 Aug 9.

ARTÍCULO 3

Genotype modulators of clinical severity in McArdle disease. Neurosci Lett. 2007 Jul 18;422(3):217-22. Epub 2007 Jun 21.

Resumen

En este artículo se ha intentado encontrar alguna evidencia que pudiera explicar la variabilidad fenotípica observada en los pacientes con enfermedad de McArdle. Este hecho contrasta con la aparente homogeneidad bioquímica de los mismos en los que la actividad de la miofosforilasa suele ser indetectable prácticamente.

En concreto, el objetivo de este trabajo consistió en determinar la posible asociación entre la intensidad clínica de la enfermedad, utilizando la escala de gravedad clínica creciente descrita por el grupo del Dr. Martinuzzi (Martinuzzi, et al., 2003), y determinados polimorfismos conocidos de varios genes que juegan un papel importante en la función muscular y en la capacidad física. Así se han estudiado los siguientes genotipos: p.R50X del gen *PYGM*, polimorfismo de inserción-delección (I/D) del gen *ACE*, p.Q12X del gen *AMPD1*, p.G482S del gen *PPARGC1A*, y p.R577X del gen *ACTN3*. Además, se han considerado la influencia en el fenotipo de otros posibles factores como el sexo y la edad.

Estos cinco genotipos se estudiaron en 99 pacientes diagnosticados de esta enfermedad en los que se caracterizaron los dos alelos mutados del gen *PYGM*. Se ha observado una influencia del sexo en el fenotipo de la enfermedad, siendo el grado de afectación clínica mayor en las mujeres ($P=0,019$) que en los hombres. El 41% de las mujeres se situó en el nivel de mayor gravedad de la escala frente al 20% de los hombres. Por otro lado, se encontró una asociación ($P<0,0001$) entre el número de alelos *D* del gen *ACE* y una mayor gravedad clínica. Además, la frecuencia del alelo *D* del gen *ACE* fue del 88,45% entre los pacientes pertenecientes al grupo de mayor gravedad.

En el resto de los genotipos estudiados en los genes *PYGM*, *AMPD1*, *PPARGC1A*, y *ACTN3* no se encontró ninguna asociación con el fenotipo clínico. Así mismo, tampoco se halló ninguna asociación entre edad y fenotipo.

Genotype modulators of clinical severity in McArdle disease

Juan C. Rubio^{a,b}, Félix Gómez-Gallego^c, Catalina Santiago^c, Inés García-Consuegra^{a,b},
Margarita Pérez^c, María I. Barriopedro^c, Antoni L. Andreu^{b,d},
Miguel A. Martín^{a,b}, Joaquín Arenas^{a,b}, Alejandro Lucia^{c,*}

^a Centro de Investigación, Hospital Universitario 12 de Octubre, 28041 Madrid, Spain

^b Centro de Investigación Biomedica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Spain

^c Universidad Europea de Madrid, Villaviciosa de Odón, 28670 Madrid, Spain

^d Centre d'Investigacions en Bioquímica y Biología Molecular (CIBBIM), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Received 30 April 2007; received in revised form 11 June 2007; accepted 14 June 2007

Abstract

The phenotypic manifestation of McArdle disease varies considerably from one individual to the next. The purpose of this study was to assess the possible association between the clinical severity of the disease, and each of the genotypes *PYGM* (R50X), *ACE* (I/D), *AMPD1* (Q12X), *PPARGC1A* (G482S) and *ACTN3* (R577X). We also assessed links between clinical disease severity and other potential phenotype modulators such as age or gender. McArdle disease was diagnosed in 99 patients of Spanish origin (60 male, 39 female; age range 8–81 years) by identifying the two mutant alleles of the *PYGM* gene. Disease severity was assessed using the grading scheme previously reported by Martinuzzi et al. [A. Martinuzzi, E. Sartori, M. Fanin, et al., Phenotype modulators in myophosphorylase deficiency, *Ann. Neurol.* 53 (2003) 497–502]. Significant correlation was observed (exact two-sided $P < 0.0001$) between the number of D alleles of the *ACE* gene and the disease severity score. Rank-order correlation coefficients were 0.296 (95% CI: 0.169, 0.423) (Kendall's τ) and 0.345 (95% CI: 0.204, 0.486) (Somer's D). No significant relationships were detected between clinical severity and the remaining genotypes examined. Finally, disease severity was significantly worse in women with the disease. Our findings indicate that both *ACE* genotype and gender contribute to how McArdle disease manifests in an individual patient. The role of other candidate genes remains to be elucidated.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: *ACE*; *ACTN3*; *AMPD1*; *PPARGC1A*; *PYGM*

Human muscle glycogen phosphorylase (MPL) deficiency (McArdle disease) is an uncommon metabolic disorder characterized by exercise intolerance, with symptoms such as premature fatigue and weakness during exertion sometimes accompanied by myalgia and cramps [23,35]. Exercise-induced rhabdomyolysis is also a common feature of McArdle disease.

The molecular basis of McArdle disease has been established through the identification of ~90 mutations in the gene (*PYGM*) that codes for the MPL enzyme, the most common being the R50X mutation (formerly known as R49X) [3,20,31,36]. However, this does not explain the wide individual variability that exists in the phenotypic manifestation of the disease, with some patients being minimally symptomatic (and only diagnosed because of another affected family member) and others showing

extreme exercise intolerance [21,31]. Such clinical variability contrasts with the remarkable biochemical homogeneity of affected patients in that MPL activity is almost invariably undetectable in biopsy specimens [31]. It is presently thought that genes that play a role in muscle function and exercise capacity could well act as modulators of the phenotypic expression of the disease. Thus, Martinuzzi et al. [21] found that a candidate gene [angiotensin-converting enzyme (*ACE*)] was significantly correlated with the clinical severity of disease in 47 patients, and noted a strong association between a severe phenotype and the number of D alleles of this gene.

Given that the manifestations and clinical severity of McArdle disease are reflected mainly by a patient's degree of exercise intolerance, we felt it would be interesting to assess the influence of other candidate genes whose effects on human exercise capacity are well established. A particularly promising candidate is the peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α gene (*PPARGC1A*), a coactivator of the subset of oxidative

* Corresponding author. Tel.: +34 91 664 78 00; fax: +34 91 616 82 65.
E-mail address: alejandro.lucia@uem.es (A. Lucia).

Table 1
PYGM mutations identified in 99 Spanish McArdle patients

Type of mutation	Total number of patients	% Total	Male patients	Female patients
R50X/R50X	40	40.40	23	17
R50X/W798R	13	13.13	8	5
W798R/W798R	4	4.04	4	0
R50X/G205S	4	4.04	3	1
R50X/K754NfsX49	4	4.04	4	0
R50X/L5VfsX22	3	3.03	0	3
R50X/A365V	3	3.03	2	1
G205S/c.1768 + 1G > A	2	2.02	1	1
R50X/R94W	2	2.02	2	0
R50X/R602W	2	2.02	0	2
G205S/G205S	2	2.02	2	0
W388SfsX34/K754NfsX49	2	2.02	1	1
R50X/T488N	2	2.02	1	1
C784X/R94W	1	1.01	1	0
R50X/A704V	1	1.01	0	1
R50X/R576X	1	1.01	1	0
R50X/c.1768 + 1G > A	1	1.01	0	1
A660D/A660D	1	1.01	1	0
R50X/A660D	1	1.01	1	0
R50X/D534VfsX5	1	1.01	0	1
R50X/Q755X	1	1.01	0	1
R50X/E349X	1	1.01	1	0
E125X/E125X	1	1.01	1	0
R194W + E797VfsX18/R194W + E797VfsX18	1	1.01	1	0
G205S/I83F	1	1.01	1	0
R50X/c.211-217dupCGCAGCA	1	1.01	0	1
G174D/c.1827G > A	1	1.01	1	0
N134KfsX161/R494AfsX7	1	1.01	0	1
c.1827G > A/c.1827G > A	1	1.01	0	1

phosphorylation (*OXPHOS*) genes that control glucose and lipid oxidation, skeletal muscle fiber-type formation and mitochondrial biogenesis [6,25,34,37]. In effect, the *PPARGC1A* (G482S) genotype has been related to improved human aerobic capacity [7,15,16]. Another candidate gene is *ACTN3*, which encodes α -actinin-3, an actin-binding protein that is the main Z-disc component of skeletal muscle [33]. Despite the conservation of α -actinin-3 throughout evolution, a significant proportion of healthy individuals (e.g., ~18% of Caucasians) lack this protein since they are homozygous for a premature stop codon polymorphism (577X) in the *ACTN3* gene [24]. This genetic variation is related to no known disease phenotype and might in fact confer a beneficial effect on human muscle endurance performance [42].

Our study was designed to assess a possible relationship between the clinical severity of McArdle disease (using a grading system described elsewhere [21]) and each of the *PPARGC1A* (G482S) and *ACTN3* (R577X) genotypes in 99 McArdle patients of Spanish origin. We also examined possible links between disease severity and the *ACE* (I/D), *AMPD1* (Q12X) and *PYGM* (R50X) genotypes, along with age and gender as potential phenotype modulators.

We recruited 99 Caucasian McArdle patients (60 male, 39 female; age range 8–81 years) from 93 unrelated families. All the patients were of Spanish descent. Written informed consent was obtained from each patient or parents of the children participating in the study. The study protocol was approved by the ethics committee of our institution and was conducted in

accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki. Diagnosis of McArdle disease was based on the findings of a muscle biopsy (i.e., negative staining for MPL and undetectable enzyme activity) in 46 patients, and by genetic analysis (identifying the two mutant alleles of the *PYGM* gene) [31] in all patients (Table 1). All patients reported typical symptoms of the disease since childhood and had been recommended by their physicians to refrain from physical activity other than that required for daily living. The patients' lifestyle had thus been sedentary since childhood.

Disease severity was scored using a four-class grading system developed by Martinuzzi et al. [21], in which 0 = asymptomatic or virtually asymptomatic (mild exercise intolerance, but no functional limitation in any daily life activity); 1 = exercise intolerance, cramps, myalgia, and limitation of acute strenuous exercise, and occasionally in daily life activities; no record of myoglobinuria, no muscle wasting or weakness; 2 = as above, plus recurrent exertional myoglobinuria, moderate restriction in exercise, and limitation in daily life activities; 3 = fixed muscle weakness, with or without wasting and severely limited exercise and most daily life activities. Each patient was assigned to one of these classes after reviewing their records and subjecting them to a neurological evaluation and personal interview [21].

In all subjects, genomic DNA was extracted from peripheral EDTA-treated anti-coagulated blood. Sequences corresponding to each mutation of the *ACE*, *AMPD1*, *PPARGC1A* and *ACTN3* genes were then amplified by polymerase chain reaction (PCR).

Table 2

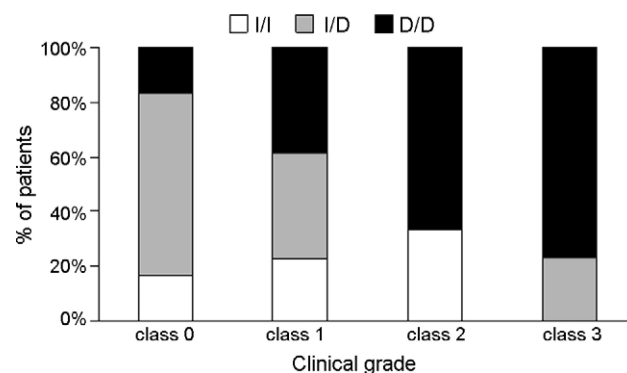
Disease severity scores assigned to the patients

Severity class	Total number of patients (%)	Male patients (%)	Female patients (%)	Male to female ratio	Mean \pm S.D. age (range)
0	6 (6.1%)	5 (8.3%)	1 (2.6%)	5/1	45 \pm 22 (25, 81)
1	62 (62.6%)	41 (68.3%)	21 (53.8%)	41/21	37 \pm 16 (8, 78)
2	3 (3.0%)	2 (3.3%)	1 (2.6%)	2/1	36 \pm 6 (31, 43)
3	28 (28.3%)	12 (20.0%)	16 (41.0%)	1/1	40 \pm 5 (16, 68)
Total	99			62/37	39 \pm 16 (8, 81)

The two alleles of the human *ACE* gene differ in terms of the presence (insertion or *I* allele) or absence (deletion or *D* allele) of a 287-bp *Alu* repeat element in intron 16, which has been associated with circulating levels of the enzyme [27]. The primers and PCR conditions that we used for the *ACE* *I/D* polymorphism have been previously described [17]. The primers and PCR conditions described by Tsujino et al. [36] were used to identify *AMPD1* genotypes. The amplified fragment was digested with *MaeII*. For the *PPARGC1A* (G482S) genotype, we followed the methodology reported by Ek et al. [5], using *MspI* for enzymatic digestion of amplicons. Finally, *ACTN3* (R577X) genotypes were identified using the primers and PCR conditions described elsewhere, with digestion of amplicons using *DdeI* [18,24].

We used a non-parametric test of independence (based on Kendall's τ rank-order coefficient) to evaluate the relationship between the following ordinal variables: clinical scoring of the disease and each of genotypes *ACE* (*I/D*), *AMPD1* (Q12X), *PYGM* (R50X), *PPARGC1A* (G482S) and *ACTN3* (R577X). We also evaluated the strength of the correlations between these pairs of variables using the Somer's D rank-order correlation coefficient. To assess the effects of age (i.e., a quantitative variable) on clinical severity, we compared the mean age of the patients assigned to the different categories using the Kruskal–Wallis test. Finally, the possible influence of gender (i.e., a nominal variable) was assessed by comparing the mean clinical scores of male and female patients using the Mann–Whitney *U*-test. The level of significance was set at 0.05 for all the statistical analyses. Descriptive data are reported as the mean \pm S.D.

Table 2 provides the disease severity scores obtained for our patients. No effects of age on disease severity were detected since mean patient ages did not differ between the four disease severity classes ($P=0.420$ for the effect of age using the Kruskal–Wallis test). A significant gender effect, however, emerged since disease severity was greater ($P=0.019$) in women than men (mean clinical scores 1.82 ± 1.02 versus 1.35 ± 0.90 , respectively). The proportions of patients assigned to severity classes 0 and 1 were

Fig. 1. Disease severity stratified by number of *ACE* D alleles.

higher in men whereas the percentage of patients included in class 3 was considerably higher in women.

Allelic frequency distributions of each genotype for the entire patient population and for the patients assigned to each class are shown in Table 3. A significant relationship (exact two-sided $P<0.0001$) emerged between the number of D alleles of the *ACE* gene and disease severity for the entire patient cohort, with rank-order correlation coefficients of 0.296 (95% CI: 0.169, 0.423) (Kendall's τ) and 0.345 (95% CI: 0.204, 0.486) (Somer's D) recorded. Thus, the frequency of the D allele increased with the disease severity score (Fig. 1).

In contrast, no significant correlation was found between disease severity and each of the remaining genotypes (exact two-sided $P=0.189$ for *PYGM* (R50X), $P=0.814$ for *AMPD1* (Q12X), $P=0.561$ for *PPARGC1A* (G482S), and $P=0.436$ for *ACTN3* (R577X)). Overall, the allelic frequencies of these genotypes remained stable across the four disease severity classes.

Our study was designed to explore possible genotype–phenotype associations to try to explain, at least partly, the individual variability that exists in the clinical manifestations of McArdle disease. We examined a patient population of 99 individuals, representing $\sim 2/3$ of the total number of affected patients in Spain. Given that the phenotypic

Table 3

Allelic frequency (%) distributions in patients

	<i>PYGM</i> R50X allele	<i>PYGM</i> No-R50X allele	<i>ACE</i> I allele	<i>ACE</i> D allele	<i>AMPD1</i> Q allele	<i>AMPD1</i> X allele	<i>PPARGC1A</i> G allele	<i>PPARGC1A</i> S allele	<i>ACTN3</i> R allele	<i>ACTN3</i> X allele
All patients	60.10	39.90	35.35	64.65	84.35	15.65	61.60	38.40	53.50	46.50
Patients class 0	58.30	41.70	50.05	49.95	91.65	8.35	66.65	33.35	50.0	50.0
Patients class 1	59.68	40.32	42.10	57.90	83.10	16.90	63.65	36.35	54.00	46.00
Patients class 2	66.66	33.34	33.33	66.67	66.65	33.35	83.35	16.65	50.00	50.00
Patients class 3	46.43	53.57	11.55	88.45	87.45	12.55	60.75	39.25	53.55	46.45

manifestations of this disease are almost exclusively restricted to symptoms of exercise intolerance (due to blocked muscle glycogenolysis), we analyzed the possible influence of two candidate genes, *PPARGC1A* and *ACTN3*, whose effects on human exercise capacity are probably the most clearly documented in the literature, along with the genes *ACE* and *AMPD1*, whose contributions to the clinical features of McArdle disease have been previously explored [21]. In agreement with the findings of these last authors [21], we found that only the *ACE* genotype could be significantly correlated with disease severity. However, a novel finding of our study was that gender seems to affect the clinical severity of the disease, with women generally showing a more severe clinical picture than men. A further significant result of our experiments was that the commonest *PYGM* genotype (R50X) failed to affect clinical severity. This is in line with our experience, in that MPL activity levels were undetectable in muscle biopsy specimens from 46 of the patients, despite the fact that our population showed 27 different *PYGM* genotypes.

Our results might be related to the fact that the *ACE* gene plays a role both in muscle and cardiovascular function during exercise, while the other three genes only modulate muscle function. An excess in the I allele (and concomitant reduction in the D allele) leads to lower ACE activity. Thus, such an excess could determine a healthier cardiovascular system along with more efficient ventriculo-vascular coupling during exercise—that is, reduced cardiac afterload [8]. Training-induced changes in ventricular mass are ACE dependent [8] and treatment with ACE inhibitors can improve the aerobic capacity of patients with severe cardiac failure [10]. The *ACE* genotype may be also associated with individual variations in muscle function, particularly substrate utilization [41]. In effect, a pharmacologically induced decrease in ACE activity increases glucose uptake (possibly through the action of bradykinin) [12–14]. Indeed, increased glucose uptake in working muscles fibers might be crucial for attenuating the exercise intolerance of McArdle patients, due to their inability to use muscle glycogen combined with their ability to oxidize blood born glucose during exercise. An improved capacity to utilize glucose as a fuel for muscle contraction accompanied by less reliance on fat metabolism would be beneficial for these patients, in that this would improve the efficiency of muscle contraction (i.e., lower metabolic cost for a given muscle to work) since glucose is a more efficient fuel in terms of the amount of ATP generated per mole of O₂ [2]. Effectively, the I allele of the *ACE* gene has been linked to improved human muscle efficiency [40].

We found no association between the *AMPD1* (Q12X) genotype and disease severity. This could be attributable to the low population frequency of our XX homozygotes ($N=3$, a similar population frequency to that cited in another study performed on Spanish individuals [29]). However, only one of the three patients who were homozygous for the Q12X mutation was assigned to the highest disease severity category (class 3). Decreased exercise capacity in healthy humans has been related to the *AMPD1* (Q12X) genotype, with XX individuals showing a low aerobic capacity and a decreased response to exercise training [26]. The findings of studies that have explored the effects

of the *AMPD1* genotype on the clinical severity of McArdle disease have been more controversial with some authors reporting a more severe phenotype in patients who are XX homozygotes [28,31,35] and others finding no such effect [11,29]. In overall agreement with our data, Martinuzzi et al. [21] detected no correlation between clinical severity scores and reduced muscle AMP deaminase activity or heterozygosity for the Q12X mutation. This could be attributable to the fact that AMP deaminase plays an important role in muscle function mainly during intense, repeated muscle contractions, e.g., athletic events [30], and not in the exercise modalities performed by most individuals, i.e., the physical activities of daily living.

Despite the essential role of the *PPARGC1A* (G482S) genotype in muscle function [6,25,34,37] and its well-documented influence on the exercise capacity of healthy humans [7,15,16], we found no genotype–phenotype association. *PPARGC1A* mRNA is expressed predominantly in tissues showing high metabolic activity that are rich in mitochondria, such as exercising skeletal muscles [32,38]. Through coactivation of the *OXPHOS* genes, *PPARGC1A* transiently controls lipid and glucose oxidation [1]. *PPARGC1A* also chronically modulates muscle oxidative capacity through the co-activation of nuclear respiratory and mitochondrial transcription factors, which in a coordinated manner induce mitochondrial biogenesis [39]. Despite its known effect on muscle function, the lack of influence of the *PPARGC1A* genotype on disease severity observed here might be related to the fact that it mainly acts on muscle oxidative capacity, a factor that usually varies little among McArdle patients [9]. This issue nevertheless requires further investigation.

We were also unable to detect a direct association between the *ACTN3* (R577X) genotype and clinical severity. Given that McArdle patients are unable to obtain energy from muscle glycogen stores, the energetics of type I fibers, i.e., α -actinin-3 deficient fibers, which are more efficient (less O₂ consumption for a given load) than type II fibers (i.e., those expressing α -actinin-3) [4], appears to favor those patients who are totally (XX homozygotes) or partially (RX heterozygotes) unable to produce α -actinin-3 in their skeletal muscles. In effect, in a previous study, we noted that female McArdle patients with the *ACTN3* R577X mutation showed improved maximal exercise capacity in a cycle-ergometer test until exhaustion over homozygous female patients who did not carry the mutation [19]. However, *ACTN3* does not seem to be associated with clinical severity, perhaps because the severity score is mostly related to exercise modalities of daily living, which are submaximal rather than maximal tasks.

Finally, a significant gender effect ($P=0.019$) was found among our patients, with women being more affected than men. Thus, 20.0% of the male patients were assigned to the highest severity class 3 versus 41.0% female patients (Table 2). We previously reported that exercise capacity was relatively more deteriorated in female ($N=22$) than male ($N=24$) McArdle patients. For instance, some female patients exhibited peak aerobic capacities, which were barely sufficient to sustain the metabolic demands of physical activities of daily living [22]. Although more work is needed, we propose that the higher mus-

cle mass in men (due to the effects of testosterone) could have a protective effect in this disease, given its course involves some degree of muscle wasting and a considerable loss of muscle power output [22]. In our experience, indeed, women patients usually report a higher degree of exercise intolerance than men during common activities of daily living. Some women show extreme muscle weakness in their arms; for instance, they have to use an electric toothbrush since they tire easily when brushing their teeth manually.

In summary, the *ACE* genotype might partly explain the individual variability observed in the manifestations of McArdle disease, the D allele of this gene being related to a greater disease severity. Gender also affects clinical severity, our findings indicating that women are more severely affected than men.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the FIS numbers PI040487, PI041157, and PI050579. J.C. Rubio was awarded a contract by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) CD06/00031 (Ministerio de Sanidad y Consumo (MSC), Madrid), and M.A. Martin holds grants from the Programa de Intensificación de la Actividad Investigadora, ISCIII (MSC) and Agencia Laín Entralgo (Consejería de Sanidad, Comunidad de Madrid). We are grateful to Ana Burton for her professional linguistic assistance.

References

- [1] A.D. Attie, C.M. Kendzierski, PGC-1 α at the crossroads of type 2 diabetes, *Nat. Genet.* 34 (2003) 244–245.
- [2] G.A. Brooks, G.E. Butterfield, R.R. Wolfe, Increased dependence on blood glucose after acclimatization to 4300 m, *J. Appl. Physiol.* 70 (1991) 919–927.
- [3] C. Bruno, D. Cassandrini, A. Martinuzzi, M. Moggio, L. Morandi, S. Servidei, T. Mongini, C. Angelini, O. Musumeci, G.P. Comi, C. Lamperti, M. Filosto, F. Zara, Minetti C, McArdle disease: the mutation spectrum of PYGM in a large Italian cohort, *Hum. Mutat.* 27 (2006) 718.
- [4] M.T. Crow, M.J. Kushmerick, Chemical energetics of slow- and fast-twitch muscles of the mouse, *J. Gen. Physiol.* 79 (1982) 147–166.
- [5] J. Ek, G. Andersen, S.A. Urhammer, T. Drivsholm, K. Borch-Johnsen, T. Hansen, O. Pedersen, Mutation analysis of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) and relationships of identified amino acid polymorphisms to type II diabetes mellitus, *Diabetologia* 44 (2001) 2220–2226.
- [6] B.N. Finck, D.P. Kelly, PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 615–622.
- [7] P.W. Franks, I. Barroso, J. Luan, V.E. Crowley, S. Brage, M.S. Sandhu, R.W. Jakes, R.P. Middelberg, A.H. Harding, A.J. Schafer, S. O'Rahilly, N.J. Wareham, PGC-1 α genotype modifies the association of volitional energy expenditure with $\text{VO}_{2\text{max}}$, *Med. Sci. Sports Exercise* 35 (2003) 1998–2004.
- [8] G. Gayagay, B. Yu, B. Hambly, A. Hahn, D.S. Celermajer, R.J. Trent, Elite endurance athletes and the ACE I allele—the role of genes in athletic performance, *Hum. Genet.* 103 (1998) 48–50.
- [9] R.G. Haller, P. Wyrick, T. Taivassalo, J. Vissing, Aerobic conditioning: An effective therapy in McArdle's disease, *Ann. Neurol.* 59 (2006) 922–928.
- [10] G. Hamroff, S.D. Katz, D. Mancini, R. Bijou, R. Patel, G. Jondeau, M.T. Olivari, S. Thomas, T.H. Le Jemtel, Addition of angiotensin II receptor blockade to maximal angiotensin-converting enzyme inhibition improves exercise capacity in patients with severe congestive heart failure, *Circulation* 99 (1999) 990–992.
- [11] S.L. Heller, K.K. Kaiser, G.J. Planner, M.H. Brooke, McArdle's disease with myoadenylate deficiency: observations in a combined enzyme deficiency, *Neurology* 37 (1987) 1039–1042.
- [12] E.J. Henriksen, S. Jacob, Effect of captopril on glucose transport activity in skeletal muscle of Obese Zucker rats, *Metabolism* 44 (1995) 267–272.
- [13] E.J. Henriksen, S. Jacob, T.R. Kinnick, M.B. Schmit, G.J. Dietze, ACE inhibition and glucose transport in insulin resistant muscle: roles of bradykinin and nitric oxide, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277 (1999) R332–R336.
- [14] S. Jacob, E.J. Henriksen, D.L. Fogt, G.J. Dietze, Effects of trandolapril and verapamil on glucose transport in insulin-resistant rat skeletal muscle, *Metabolism* 45 (1996) 535–541.
- [15] C. Ling, P. Poulsen, E. Carlsson, P. Almgren, J. Wojtaszewski, H. Beck-Nielsen, L. Groop, A. Vaag, Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1 α and PGC-1 β gene expression in twins, *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 1518–1526.
- [16] A. Lucia, F. Gomez-Gallego, I. Barroso, F. Bandrés, A.F. San Juan, J.L. Chicharro, U. Ekelund, S. Brage, C.P. Earnest, N.J. Wareham, P.W. Franks, PPARC1A genotype (Gly482Ser) predicts exceptional endurance capacity in European men, *J. Appl. Physiol.* 99 (2005) 344–348.
- [17] A. Lucia, F. Gómez-Gallego, J.L. Chicharro, K. Celaya, A. Córdova, G. Villa, J.M. Alonso, M. Barriopedro, M. Pérez, C.P. Earnest, Is there an association between ACE and CKMM polymorphisms and cycling performance status during 3-week races? *Int. J. Sports Med.* 26 (2005) 442–447.
- [18] A. Lucia, F. Gómez-Gallego, C. Santiago, C. Earnest, M. Rabadán, J.M. Alonso, J. Hoyos, A. Córdova, G. Villa, C. Foster, ACTN3 Genotype in professional endurance cyclists, *Int. J. Sports Med.* 27 (2006) 880–884.
- [19] A. Lucia, F. Gómez-Gallego, C. Santiago, J.L. Maté-Muñoz, C. Chamorro-Viña, G. Nogales-Gadea, C. Foster, J.C. Rubio, A.L. Andreu, M.A. Martín, J. Arenas, The 577X allele of the ACTN3 gene is associated with improved exercise capacity in women with McArdle's disease, *Neuromuscul. Disord.*, in press.
- [20] M.A. Martin, J.C. Rubio, J. Buchbinder, P. del Hoyo, S. Teixeira, J. Gámez, C. Navarro, J.M. Fernández, A. Cabello, Y. Campos, C. Cervera, J.M. Culebras, A.L. Andreu, R. Fletterick, J. Arenas, Molecular heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease): a genotype–phenotype correlation study, *Ann. Neurol.* 50 (2001) 574–581.
- [21] A. Martinuzzi, E. Sartori, M. Fanin, L. Valente, C. Angelini, G. Siciliano, T. Mongini, P. Tonin, G. Tomelleri, A. Toscano, L. Merlini, L.A. Bindoff, S. Bertelli, Phenotype modulators in myophosphorylase deficiency, *Ann. Neurol.* 53 (2003) 497–502.
- [22] J.L. Maté-Muñoz, M. Moran, M. Pérez, C. Chamorro-Viña, F. Gómez-Gallego, C. Santiago, L. Chicharro, C. Foster, G. Nogales-Gadea, J.C. Rubio, A.L. Andreu, M.A. Martín, J. Arenas, A. Lucia, Favorable responses to acute and chronic exercise in McArdle's patients, *Neuromuscul. Disord.* 2007 Jun 7; [Epub ahead of print].
- [23] B. McArdle, Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown, *Clin. Sci.* 10 (1951) 13–33.
- [24] M. Mills, N. Yang, R. Weinberger, A.H. Beggs, S. Easteal, K. North, Differential expression of the actin-binding proteins, α -actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy, *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 1335–1346.
- [25] P. Puigserver, B.M. Spiegelman, Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator, *Endocr. Rev.* 24 (2003) 78–90.
- [26] J. Rico-Sanz, T. Rankinen, D.R. Joannise, J.S. Skinner, J.H. Wilmore, D.C. Rao, C. Bouchard, Associations between cardiorespiratory responses to exercise and the C34T AMPD1 gene polymorphism in the HERITAGE Family study, *Physiol. Genomics* 14 (2003) 161–166.
- [27] M.J. Rieder, S.L. Taylor, A.G. Clark, D.A. Nickerson, Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme, *Nat. Genet.* 22 (1999) 59–62.
- [28] J.C. Rubio, M.A. Martin, J. Bautista, D. Segura, J. Arenas, Association of genetically proven myophosphorylase and AMP deaminase: a second case of “double trouble”, *Neuromuscul. Disord.* 7 (1997) 387–389.
- [29] J.C. Rubio, M.A. Martin, P. Del Hoyo, Y. Campos, D. Segura, C. Navarro, J.R. Ricoy, A. Cabello, J. Arenas, Molecular analysis of Spanish patients with AMP deaminase deficiency, *Muscle Nerve* 23 (2000) 1175–1178.

- [30] J.C. Rubio, M.A. Martin, M. Rabadan, A.F. San Juan, J.M. Alonso, J.L. Chicharro, M. Pérez, J. Arenas, A. Lucia, Frequency of the C34T mutation of the AMPD1 gene in World-class endurance athletes—does this mutation impair performance? *J. Appl. Physiol.* 98 (2005) 2108–2112.
- [31] J.C. Rubio, I. Garcia-Consuegra, G. Nogales-Gadea, A. Cabello, A. Lucia, A.L. Andreu, J. Arenas, M.A. Martin, A proposed molecular diagnosis flowchart for myophosphorylase deficiency (McArdle disease) in blood samples from Spanish patients, *Hum. Mutat.* 28 (2007) 203–204.
- [32] R.K. Semple, V.C. Crowley, C.P. Sewter, C. Christodoulides, R.V. Considine, A. Vidal-Puig, S. O'Rahilly, Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1 α is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28 (2004) 176–179.
- [33] J.M. Squire, Architecture and function in the muscle sarcomere, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (1997) 247–257.
- [34] S. Terada, I. Tabata, Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1 α protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286 (2004) E208–E216.
- [35] S. Tsujino, S. Shanske, J.E. Carroll, R.L. Sabina, S. DiMauro, Double trouble: combined myophosphorylase and AMP deaminase deficiency in a child homozygous for nonsense mutations at both loci, *Neuromuscul. Disord.* 4 (1995) 263–266.
- [36] S. Tsujino, S. Shanske, S. DiMauro, Molecular genetic heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle disease), *N. Engl. J. Med.* 329 (1993) 241–245.
- [37] R.J. Tunstall, K.A. Mehan, G.D. Wadley, A. Bonen, M. Hargreaves, D. Cameron-Smith, Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283 (2002) E66–E72.
- [38] R.B. Vega, J.M. Huss, D.P. Kelly, The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor α in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 1868–1876.
- [39] Y.X. Wang, C.L. Zhang, R.T. Yu, M.C. Nelson, C.R. Bayuga-Ocampo, J. Ham, H. Kang, R.M. Evans, Regulation of muscle fiber type and running Endurance by PPAR δ , *PLoS Biol.* 2 (2004) e294.
- [40] A.G. Williams, M.P. Rayson, M. Jubb, M. World, D.R. Woods, M. Hayward, J. Martin, S.E. Humphries, H.E. Montgomery, The ACE gene and muscle performance, *Nature* 403 (2000) 614.
- [41] D.R. Woods, S.E. Humphries, H.E. Montgomery, The ACE I/D polymorphism and human physical performance, *Trends Endocrinol. Metab.* 11 (2000) 416–420.
- [42] N. Yang, D.G. Macarthur, J.P. Gulbin, A.H. Beggs, S. Easteal, K. North, ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance, *Am. J. Hum. Genet.* 73 (2003) 627–631.

ARTÍCULO 4

***AMPD1* genotypes and exercise capacity in McArdle patients. Int J Sports Med. 2008 Apr;29(4):331-5. Epub 2007 Aug 9.**

Resumen

Hemos estudiado en una serie de 44 pacientes con enfermedad de McArdle (23 hombres y 21 mujeres) la posible asociación entre la mutación c.34C>T del gen *AMPD1* y la capacidad funcional de los mismos que se evaluó por la medida directa de los índices de capacidad de ejercicio (consumo pico de oxígeno; $\text{VO}_{2\text{pico}}$, umbral ventilatorio; VT, eficiencia mecánica bruta (del inglés “Gross efficiency”, GE) tras una prueba gradual hasta agotamiento y otra prueba de carga constante de 12 min en un cicloergómetro.

La enzima mioadenilato desaminasa (MADA) que está codificada por el gen *AMPD1* juega un papel relevante en la función muscular y en la capacidad física, por lo que podría actuar como modulador en la expresión fenotípica de la enfermedad de McArdle. El 2% de la población normal presenta el genotipo mutante en homocigosis (TT) del gen *AMPD1*, y el 20% de la misma presenta el genotipo en heterocigosis (CT). La presencia de la mutación en heterocigosis puede producir una disminución de la actividad de MADA hasta del 60%.

El objetivo de este estudio fue determinar si la presencia del alelo mutante “T” podría influir negativamente en la capacidad de ejercicio de los pacientes con enfermedad de McArdle. En este sentido en la evaluación funcional diferenciada por sexo se observó que en los hombres no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los índices de capacidad física entre los genotipos CC y CT del gen *AMPD1*, mientras que en las mujeres el VT fue significativamente menor ($p < 0,05$) en el genotipo CT tras la prueba gradual. Por otro lado, tanto en mujeres como hombres los niveles pico de amonio en la prueba gradual fueron menores en el genotipo CT ($p < 0.05$).

Estos resultados indican que la presencia en heterocigosis del alelo c.34C>T del gen *AMPD1* se relaciona con una disminución de la capacidad aeróbica submáxima en mujeres con enfermedad de McArdle, y puede explicar en cierta medida la variabilidad clínica existente en la enfermedad.

AMPD1 Genotypes and Exercise Capacity in McArdle Patients

Authors

J. C. Rubio¹, M. Pérez², J. L. Maté-Muñoz², I. García-Consuegra¹, C. Chamorro-Viña², M. Fernández del Valle^{1,2}, A. L. Andreu³, M. A. Martín¹, J. Arenas¹, A. Lucía²

Affiliations

¹ Centro de Investigación, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

² Physiology, Universidad Europea de Madrid, Madrid, Spain

³ Research Centre in Biochemistry and Molecular Biology, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Key words

- glycogenosis type V
- AMP deaminase
- ventilatory threshold
- $\dot{V}O_{2peak}$

Abstract



The purpose of this study was to assess if there exists an association between *C34T* muscle adenosine monophosphate deaminase (*AMPD1*) genotypes (i.e., normal homozygotes [CC] vs. heterozygotes [CT]) and directly measured indices of exercise capacity (peak oxygen uptake [$\dot{V}O_{2peak}$], ventilatory threshold [VT], gross mechanical efficiency [GE], etc.) in 44 Caucasian McArdle patients (23 males, 21 females). All patients performed a graded cycle ergometer test until exhaustion (for $\dot{V}O_{2peak}$ and VT determination) and a 12-min constant-load test at the power output

eliciting the VT (for GE determination). We found no significant difference in indices of exercise capacity between CC ($n = 18$) and CT genotypes ($n = 5$) in the group of male patients ($p > 0.05$). In contrast, the $\dot{V}O_2$ at the VT was significantly lower ($p < 0.05$) in CT ($n = 4$; 7.9 ± 0.4 ml/kg/min) than in CC female patients ($n = 17$; 11.0 ± 0.9 ml/kg/min). In summary, heterozygosity for the *C34T* allele of the *AMPD* gene is associated with reduced submaximal aerobic capacity in female patients with McArdle disease and might partly account, in this gender, for the variability that exists in the phenotypic manifestation of the disease.

Introduction



Human muscle glycogen phosphorylase (MPL) deficiency (glycogenosis type V or McArdle disease) is an uncommon metabolic disorder characterized by exertional intolerance (premature fatigue and weakness during exertion in most patients, often accompanied by myalgia and cramps) [21,33]. Exercise-induced rhabdomyolysis can also occur.

Although the molecular basis of McArdle disease has been demonstrated by the identification of ~90 mutations in the gene (*PYGM*) encoding for MPL, the most common being the *R50X* mutation (formerly known as *R49X*) [1,17,31,33], it does not provide an explanation for the considerable degree of individual variability in the phenotypic manifestation of the disease, i.e., with a few patients being minimally symptomatic (and only diagnosed because of another affected family member) while others have extreme exercise intolerance [17,18]. Such clinical variability also contrasts with the remarkable biochemical homogeneity of the disease, i.e., usually total lack of MPL activity in biopsy specimens [18,31]. Accordingly, mutations or polymorphisms in other

genes that are known to play an important role in muscle function and exercise capacity might act as modulators of the phenotype expression of McArdle disease [18].

Adenosine monophosphate deaminase (AMPD) is an important regulator of muscle energy metabolism, by converting AMP to inosine monophosphate (IMP) with liberation of ammonia. This enzyme displaces the equilibrium of the myokinase reaction toward ATP production [14,28]. Also, the AMPD reaction is the initial reaction of the purine nucleotide cycle (PNC), which plays a central role in the salvage of adenine nucleotides and in determining energy charge [28]. The skeletal muscle-specific isoform (M) of AMPD is encoded by the *AMPD1* gene. A nonsense mutation (*C34T*) resulting in the premature stop of protein synthesis is the main cause of AMPD deficiency [23]. Approximately 1–2% of the general population is homozygous (TT) for this mutation and ~20% is heterozygous (CT) [28]. The activity of muscle AMPD can be markedly reduced even in CT heterozygotes, i.e., representing only 38–39% of its activity in healthy controls (CC) [24,32] and in some cases, can be as low as 16% of its normal activity [25]. Norman et al. [25] reported that CT

accepted after revision
March 10, 2007

Bibliography

DOI 10.1055/s-2007-965358
Int J Sports Med 2007; 28: 1–5
© Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York ·
ISSN 0172-4622

Correspondence

Prof. Alejandro Lucía
Physiology
Universidad Europea de Madrid
Villaviciosa de Odón
28670 Madrid
Spain
Phone: + 349 16 64 78 00 ■
Fax: + 349 16 16 82 65 ■
alejandro.lucia@
mrfs.cisa.uem.es

heterozygotes have reduced capacities to deplete ATP pools and accumulate inosine monophosphate (IMP) during intense exercise. Thus, some degree of impairment in functional capacity associated to the *CT* genotype cannot be ruled out, at least in those humans with concomitant chronic disorders that produce exercise intolerance, e.g., McArdle disease. Given its high population frequency, the *CT* genotype could explain some of the variability that exists in the exercise capacity of McArdle patients.

It was the purpose of this study to assess if there is an association between *C34T AMPD1* genotypes (i.e., normal homozygotes [*CC*] vs. heterozygotes [*CT*]) and directly measured indices of exercise capacity in McArdle patients. Both men and women were studied separately to remove the gender effect on exercise capacity (e.g., usually higher $\dot{V}O_{2peak}$ levels in men for a given level of physical activity). We hypothesized that the mutant *T* allele might negatively influence the exercise capacity of these patients, at least of those with the lowest fitness level.

Methods

Subjects

Forty-four adult Spanish McArdle patients (23 males, 21 females) were recruited and provided written informed consent to participate in this study. All of them are of the same European ancestry. The study was approved by the institutional ethics committee. McArdle disease was diagnosed by muscle biopsy, i.e., muscle histochemistry showing MPL deficiency and biochemistry displaying a total lack of enzyme activity, and genetic analysis, i.e., sequencing of the *PYGM* gene showing that the subjects were homozygotes or compound heterozygotes for documented *R50X*, *G204S* or other mutations [1,17,31,33]. In addition, most patients reported typical symptoms of the disease since childhood (including in most cases the “second wind phenomenon”, i.e., attenuated fatigue, breathlessness or tachycardia after 5–10 minutes of dynamic exercise) with a great interindividual variability in their self-reports of exercise intolerance, including relatives (e.g., one 34-yr-old patient reported that he was able to ride his bicycle at moderate-to-high speeds for >3 hours during the 2nd decade of life whereas his sister reported muscle weakness and cramps during walking at a slow pace). They all had been given advice by their physicians to refrain from physical activities except for those necessary for daily living (housekeeping tasks, walking at slow pace, gardening, lifting very light weights, etc.). Thus, they followed a sedentary lifestyle since childhood and did not perform any type of systematic exercise training.

Genotype determinations

Genomic DNA was extracted from peripheral blood anticoagulated with EDTA according to standard phenol/chloroform procedures followed by alcohol precipitation. To detect the *C34T* (*C* to *T* transition in nucleotide 34) in exon 2 of *AMPD1*, a PCR fragment containing the mutation was amplified using the primers and PCR conditions described by Tsujino et al. [33]. The fragment was digested with *MaeII* (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) and electrophoresed through 2% agarose gel. The wild-type PCR product is cleaved by the enzyme, whereas the mutant is not.

In those patients showing the *C34T* mutation, we also studied the *G468-T* mutation of *AMPD1* as previously described by Gross

et al. [9]. This mutation has also been associated with deficiency of muscle AMPD and exercise-induced myalgia [9].

Exercise tests

After an examination (including ECG) to rule out contraindications for exercise testing, all the subjects reported to our laboratory after an overnight fast and performed a graded exercise test (workload increases of $10\text{ W} + 10\text{ W}\cdot\text{min}^{-1}$ until volitional exhaustion) for $\dot{V}O_{2peak}$ and ventilatory threshold (VT) determination on a cycle ergometer (Ergoselect 200K; Ergoline GmbH, Bitz, Germany). After a 10-min rest, subjects performed a 12-min constant-load test at the power output corresponding to the VT. We have previously applied this type of constant-load test in patients with McArdle disease [16].

For ethical/safety reasons (to prevent the occurrence of muscle cramps and exercise-induced myoglobinuria) and for physiological reasons (to allow maximal utilization of blood glucose for energy production and thus attainment of subjects' highest possible exercise capacity), the first exercise test was preceded by the ingestion (30-min pre-exercise) of a 660 ml solution containing 75 g of carbohydrates (sucrose) as recommended by Vissing and Haller [34], which was followed by a 15-min warm-up period (free-wheel pedalling). We have previously used pre-exercise carbohydrate ingestion for $\dot{V}O_{2peak}$ determination in McArdle patients with good results [16,27].

Respiratory gas exchange data were collected during the tests using an automated system (V_{max} 29C; Sensesmedics, ■city?, CA, USA). Peak oxygen uptake ($\dot{V}O_{2peak}$) was defined as the highest $\dot{V}O_2$ for a 30-s interval. The VT was determined using the criteria of an increase in both the ventilatory equivalent for oxygen ($\dot{V}E\cdot\dot{V}O_2^{-1}$) and end-tidal pressure of oxygen ($P_{et}O_2$) with no concomitant increase in the ventilatory equivalent for carbon dioxide ($\dot{V}E\cdot\dot{V}CO_2^{-1}$) [15]. Two independent experienced observers detected VT. If there was disagreement, we obtained the opinion of a third investigator. Gross mechanical efficiency (GE) was calculated from the constant-load tests as the ratio of work accomplished $\cdot\text{min}^{-1}$ (i.e., W converted to $\text{kcal}\cdot\text{min}^{-1}$) to energy expended $\cdot\text{min}^{-1}$ (i.e., average $\dot{V}O_2$ from the 3rd to 12th min, in $\text{kcal}\cdot\text{min}^{-1}$) using the corresponding energy equivalent for each $\dot{V}O_2$ value based on the corresponding value of respiratory exchange ratio (RER) [4].

Heart rate (HR) was monitored during each test using 12-lead ECG tracings. Capillary blood samples (75 μL) for the measurement of blood lactate (YSI 1500; Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, USA) and ammonia (Ammonia Checker, Menarini Diagnostics, Barcelona, Spain) were obtained from a fingertip pre-exercise and immediately after completion of each maximal and constant-load test. Peripheral venous blood was also collected from patients 1) at baseline and immediately before the maximal tests (i.e., after sucrose ingestion) to monitor changes in blood glucose with pre-exercise carbohydrate ingestion, and 2) at baseline and 1 hour after exercise to monitor serum creatine kinase activity (with an automated analyzer, Hitachi 911, ■city, country?).

Statistical analysis

To test the hypothesis that the mutant *T* allele of the *AMPD1* gene may negatively influence exercise capacity phenotypes ($\dot{V}O_{2peak}$, VT, GE, etc.) in McArdle patients, we compared the mean values of these phenotypes between carriers of the *T* allele (*CT* heterozygotes) and noncarriers of this allele (*CC* homozygotes) within each group of female and male patients, respectively, with a

Table 1 Results of exercise tests in male patients according to *AMPD1* C34T genotypes

Variable	No mutation CC (n = 18)	Mutation CT (n = 5)
Demographics		
Age (years)	37 ± 3	38 ± 3
Height (cm)	172.4 ± 1.5	170.7 ± 1.6
Weight (kg)	74.6 ± 2.2	75.4 ± 6.5
Blood variables at baseline		
[glucose] (mg·dl ⁻¹) before sucrose ingestion	5.0 ± 0.3	4.8 ± 0.4
[glucose] (mg·dl ⁻¹) after sucrose ingestion	7.3 ± 0.3	7.1 ± 0.3
[lactate] (mM·l ⁻¹) before sucrose ingestion	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
[NH ₃ ⁺] (μmol·l ⁻¹)	95.7 ± 17.4	37.6 ± 6.3*
CK (IU·l ⁻¹)	2 889 ± 588	3 118 ± 1 520
Graded tests		
$\dot{V}O_{2peak}$ (ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	19.2 ± 1.1	16.9 ± 0.6
HR _{peak} (beats·min ⁻¹)	152 ± 6	157 ± 5
W _{peak} (W·kg ⁻¹)	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0
[lactate] _{peak} (mM·l ⁻¹)	2.0 ± 0.2	1.4 ± 0.3
Peak [NH ₃ ⁺] (μmol·l ⁻¹)	252.9 ± 26.2	179.0 ± 19.8*
$\dot{V}O_2$ at the VT (ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	12.6 ± 0.6 (n = 15)	13.4 ± 1.3 (n = 5)
Constant-load tests		
GE (%)	12.9 ± 0.8	13.6 ± 0.8
RER	0.86 ± 0.01	0.82 ± 0.01
[lactate] (mM·l ⁻¹) at end-test	1.7 ± 0.2	1.7 ± 0.5
[NH ₃ ⁺] (μmol·l ⁻¹) at end-test	173.8 ± 22.0	141.2 ± 39.2
CK after exercise session (IU·l ⁻¹)	3 157 ± 718	3 220 ± 1 595

Symbol: * denotes statistical significance ($p < 0.05$) for CC homozygotes vs. CT heterozygotes. Abbreviations: $\dot{V}O_{2peak}$ (peak oxygen uptake), VT (ventilatory threshold), HR_{peak} (peak HR attained), W_{peak} (peak power output attained, in W), GE (gross mechanical efficiency), RER (respiratory exchange ratio), CK (creatin kinase activity in serum)

Mann-Whitney U test using the SPSS software (version 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The level of significance was set at $p < 0.05$. Demographic and physiological data ($\dot{V}O_{2peak}$, VT, GE, etc) are presented as mean ± SEM.

Results

No patient was homozygous for the C34T mutation, as expected in a population of $n = 44$. The distribution frequency of heterozygous (CT) genotypes ($n = 9$; 20.5% of total) is similar to the distribution reported in the literature (including Spaniards), i.e., ~ one of every five individuals [23,24,28,30]. None carried the *AMPD1* G468-T mutation previously described by Gross et al. [9]. We found no significant difference ($p > 0.05$) in indices of exercise capacity between CC and CT genotypes in the group of male patients, though baseline and peak ammonia levels after the graded tests were significantly lower in CT (Table 1). In the group of female patients, peak ammonia levels after the graded tests were also lower ($p < 0.05$) in CT individuals compared to noncarriers of the C34T mutation (Table 2). The VT was significantly lower in CT female heterozygotes than in gender-matched CC homozygotes ($p < 0.05$). No other significant difference was found.

Table 2 Results of exercise tests in female patients according to *AMPD1* C34T genotypes

Variable	No mutation (CC) (n = 17)	Mutation (CT) (n = 4)
Demographics		
Age (years)	38 ± 3	39 ± 11
Height (cm)	161.2 ± 1.7	163.3 ± 4.0
Weight (kg)	61.4 ± 2.6	66.3 ± 7.8
Blood variables at baseline		
[glucose] (mg·dl ⁻¹) before sucrose ingestion	5.2 ± 0.6	5.0 ± 0.2
[glucose] (mg·dl ⁻¹) after sucrose ingestion	7.0 ± 0.3	7.1 ± 0.5
[lactate] (mM·l ⁻¹) before sucrose ingestion	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1
[NH ₃ ⁺] (μmol·l ⁻¹)	75.2 ± 14.4	44.3 ± 8.5
CK (IU·l ⁻¹)	1 797 ± 538	985 ± 403
Graded tests		
$\dot{V}O_{2peak}$ (ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	13.9 ± 1.1	12.6 ± 1.8
HR _{peak} (beats·min ⁻¹)	149 ± 6	140 ± 6
W _{peak} (W·kg ⁻¹)	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1
[lactate] _{peak} (mM·l ⁻¹)	1.7 ± 0.1	1.5 ± 0.1
Peak [NH ₃ ⁺] (μmol·l ⁻¹)	208.8 ± 25.7	117.5 ± 8.5*
$\dot{V}O_2$ at the VT (ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	11.0 ± 0.9 (n = 16)	7.9 ± 0.4* (n = 4)
Constant-load tests		
GE (%)	12.0 ± 0.9	14.9 ± 0.5
RER	0.88 ± 0.01	0.84 ± 0.03
[lactate] (mM·l ⁻¹) at end-test	1.7 ± 0.1	1.5 ± 0.1
[NH ₃ ⁺] (μmol·l ⁻¹) at end-test	120.7 ± 15.3	97.3 ± 14.7
CK after exercise session (IU·l ⁻¹)	1 838 ± 538	1 008 ± 412

Symbol: * denotes statistical significance ($p < 0.05$) for CC homozygotes vs. CT heterozygotes. Abbreviations: $\dot{V}O_{2peak}$ (peak oxygen uptake), VT (ventilatory threshold), HR_{peak} (peak HR attained), W_{peak} (peak power output attained, in W), GE (gross mechanical efficiency), RER (respiratory exchange ratio), CK (creatin kinase activity in serum)

Discussion

Given the high proportion of individuals who are heterozygotes for the *AMPD1* C34T mutation (~ 20% of total population), we attempted to identify if this variant is, at least partly, a possible genetic modulator of the considerable variability that exists in the exercise capacity of McArdle patients. Such variability exists irrespective of the fact that most of these patients follow a similar, sedentary lifestyle and they all show inactivity of MPL, resulting in the inability to allow glycogen breakdown in working muscles. The main finding of our study was that, in women with McArdle disease, heterozygosity for the T allele is associated with decreased submaximal aerobic capacity, i.e., reduced ventilatory threshold. No association was found in men with McArdle disease between C34T genotypes and indices of exercise capacity, suggesting that partial AMPD deficiency can influence the exercise capacity only of those McArdle patients exhibiting poorest fitness level, i.e., usually women, who as a group show a more deteriorated capacity than men. In female patients, for instance, the $\dot{V}O_2$ at the VT (≤ 11 ml/kg/min) was barely adequate to support the energy cost of even normally paced ambulation (4–5 km·hr⁻¹). Although, in terms of genetic association studies, our sample size (total $n = 44$) is limited, it must be emphasized that McArdle disease is a rare condition. Ours is, by far, the largest sample of McArdle patients whose exercise capacity has been thoroughly evaluated. We estimate that we have studied more than one-third of the total McArdle disease patient population in Spain. Our subject sample may thus be representative of the total possible patient population.

Our study is limited, at least partly, by the fact that we did not perform muscle biopsies in our 44 patients to confirm the degree of decrease in muscle AMPD activity in *CT* heterozygotes, or the muscle levels of several metabolites (i.e., inosine, IMP, etc.) in heterozygous compared to homozygous subjects with no mutation. In any case, the results of previous biopsy studies have shown that the activity of muscle AMPD can be significantly reduced in *CT* individuals, i.e., representing only 38–39% of its activity in *CC* controls [24,32]. In our study, blood levels of ammonia, a metabolite that largely derives from the AMPD reaction, were significantly reduced at peak intensities (end of ramp tests) in both women and men who are *CT* heterozygotes compared to gender-matched *CC* patients. This suggests a significant reduction in the activity of muscle AMPD in *CT* patients. Finally, the fact that we analyzed a large number of physiological indicators of both maximal and submaximal endurance and of functional capacity, together with biochemical variables, should overcome, at least partly, the aforementioned limitation.

Although some controversy exists concerning the *TT* genotype, it is generally accepted that, in healthy humans (including elderly people [26]) the exercise capacity of *CT* heterozygotes is not usually decreased compared to *CC* homozygotes. This does not preclude that the *CT* genotype could have a negative effect on some indices of aerobic capacity in humans with markedly deteriorated functional capacity due to another coexisting muscle disorder, i.e., women with McArdle disease. In a study on 47 McArdle patients (including 15 women), Martinuzzi et al. [18] showed no significant association between heterozygosity for the *AMPD1* C34T mutation and the clinical severity of McArdle disease. Clinical severity was assessed with a four-class classification based on the patients' personal reports and clinical evaluation of exercise intolerance, muscle weakness/wasting or myoglobinuria. It is, however, not possible to establish a parallelism between the present findings and those by Martinuzzi et al. [18], as here we directly measured exercise capacity.

Our main finding is of clinical relevance, as extensive research has shown the functional/clinical significance of the $\dot{V}O_2$ at the VT in patients with other chronic diseases, including cardiopulmonary disease and cancer, who have very poor exercise tolerance as do our subjects [22]. The $\dot{V}O_2$ value ($\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) at the VT is considerably lower in patients than in healthy controls and tends to decrease with the severity of the disease, which makes the VT an indicator of exercise tolerance in people with chronic diseases. For instance, the VT of patients with chronic heart failure decreases progressively as New York Heart Association (NYHA) functional advances [13,19], e.g., $33\text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ in healthy controls vs. 23, 17 and $13\text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ in class I, II and III patients, respectively [19]. Further, in chronic heart failure patients (with coronary artery disease or dilated cardiomyopathy among other diseases), the risk of early death increases considerably if the $\dot{V}O_2$ at the VT is $<11\text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ [7]. The VT also has practical implications in daily living and quality of life as this variable is an indicator of sustainable exercise capacity in both patients with chronic diseases and in deconditioned individuals [22]. Markedly reduced VT values, such as those observed in *CT* female patients, result in unpleasant symptoms of breathlessness and early fatigue during physical activities of daily living [22].

The reasons for the VT to occur at lower workloads in *CT* compared to *CC* female patients are not apparent, especially when considering that this phenomenon was not corroborated in male patients. We hypothesize that adenosine levels might play a role.

Since the conversion of AMP to IMP is diminished in *CT* individuals [25] or [25], an elevation occurs in AMP levels, which can also lead to adenosine accumulation in the muscle interstitium [28]. Adenosine increases are more marked in AMPD-deficient compared with normal muscle [25]. In turn, extracellular adenosine may significantly stimulate ventilation [20]. Although the ventilatory effects of adenosine were originally ascribed to activation of carotid chemoreceptors [6,8,20], more recent evidence suggests an effect mediated by sensory lung receptors innervated by unmyelinated vagal C fibers [2,3]. (These nerve endings are believed to lie in close proximity to the pulmonary capillaries and alveoli, and are also present in the bronchiolar epithelium of the conducting airways [5]). The aforementioned stimulating effect of adenosine on ventilation could explain the earlier occurrence of the ventilatory threshold in partially AMPD deficient patients (*CT* genotype). In contrast, totally or partially AMPD deficient humans might compensate their deficit in PNC cycling by the stimulating effects that ADP and adenosine have on muscle oxidative metabolism [25]. Further, the higher AMP accumulation in AMPD-deficient muscle can activate AMP-activated protein kinase, which seems to enhance fatty acid oxidation and glucose transport in muscle [35]. Since oxidative capacity is markedly impaired in McArdle patients due to blocked glycogenolysis, enhanced fatty acid oxidation and glucose transport in muscle would favor *CT* patients by increasing muscle energy metabolism despite their AMPD deficiency and might explain the lack of significant differences that we encountered in the $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ of *CC* and *CT* patients. In a previous report by Heller et al. [12], the $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ of a *TT* homozygous McArdle patient was not reduced compared with three *CC* patients.

Some controversy exists regarding VT determination in individuals with McArdle disease, with some authors reporting VT identification in all patients [10,11] and others reporting lack of VT in some [29]. We succeeded in identifying the VT in ~91% of subjects. It must be emphasized that we administered a carbohydrate-rich solution (75 g of sucrose) before exercise, resulting in glucose-based energy production, as evidenced by increases in blood lactate concentration from rest to the end of ramp tests. In contrast, in previous research reporting lack of VT in some McArdle patients [29], lactate levels remained unchanged (or even decreased) during exercise. In any case, lactic acidosis is not the only cause of the VT, since it is possible that diverse stimuli originating in the active muscles (e.g., potassium, adenosine, etc.) or in the brain elicit the hyperventilation observed during intense exercise [10].

In summary, heterozygosity for the C34T allele of the *AMPD* gene is associated with reduced submaximal aerobic capacity (i.e., reduced ventilatory threshold) in female patients with McArdle disease and might partly account, in this gender, for the variability that exists in the phenotypic manifestation of the disease. Our finding is of clinical significance given 1) the very low VT values in female patients, which are among the lowest ever reported for diseased human populations, despite pre-exercise carbohydrate ingestion, an intervention that acutely improves the exercise capacity of McArdle patients [34]; and 2) the fact that deteriorated exercise capacity is the main (and almost unique) problem of these patients. No such association was found in male patients, whose exercise capacity was not so deteriorated compared to women.

Acknowledgements



Financial Support: J.C. Rubio was supported by a contract from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) CA05/0039 Ministerio de Sanidad y Consumo (MSC), Madrid, and M.A. Martin is supported by Programa de Intensificación de la Actividad Investigadora, ISCIII (MSC) and Agencia Laín Entralgo (Consejería de Sanidad, Comunidad de Madrid). This work was supported by grants from FIS numbers PI040487, PI041157, and PI050579.

References

- Bruno C, Cassandrini D, Martinuzzi A, Toscano A, Moggio M, Morandi L, Servidei S, Mongini T, Angelini C, Musumeci O, Comi GP, Lamperti C, Filosto M, Zara F, Minetti C. McArdle disease: the mutation spectrum of PYGM in a large Italian cohort. *Hum Mutat* 2006; 27: 718
- Burki NK, Alam M, Lee L-Y. The pulmonary effects of intravenous adenosine in asthmatic subjects. *Respir Res* 2006; 30 (7): 139
- Burki NK, Dale WJ, Lee L-Y. Intravenous adenosine and dyspnea in man. *J Appl Physiol* 2005; 98: 180–185
- Chavarren J, Calbet JAL. Cycling efficiency and pedalling frequency in road cyclists. *Eur J Appl Physiol* 1999; 80: 555–563
- Coleridge JCG, Coleridge HM. Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1984; 99: 1–110
- Engelstein ED, Lerman BB, Somers VK, Rea RF. Role of arterial chemoreceptors in mediating the effects of endogenous adenosine on sympathetic nerve activity. *Circulation* 1994; 90: 2919–2926
- Gitt AK, Wasserman K, Kilkowski K, Kleemann T, Kilkowski A, Bangert M, Schneider S, Schwarz A, Senges J. Exercise anaerobic threshold and ventilatory efficiency identify heart failure patients for high risk of early death. *Circulation* 2002; 10: 3079–3084
- Griffiths TL, Warren SJ, Chant AD, Holgate ST. Ventilatory effects of hypoxia and adenosine infusion in patients after bilateral carotid endarterectomy. *Clin Sci* 1990; 78: 25–31
- Gross M, Rotzer E, Kolle P, Mortier W, Reichmann H, Goebel HH, Lochmuller H, Pongratz D, Mahnke-Zizelman DK, Sabina RL. G468-T AMPD1 mutant allele contributes to the high incidence of myoadenylate deaminase deficiency in the Caucasian population. *Neuromuscul Disord* 2002; 12: 558–565
- Hagberg JM, Coyle EF, Carroll JE, Miller JM, Martin WH, Brooke MH. Exercise hyperventilation in patients with McArdle's disease. *J Appl Physiol* 1982; 52: 991–994
- Hagberg JM, King DS, Rogers MA, Mountain SJ, Jilka SM, Kohrt WM, Heller SL. Exercise and recovery ventilatory and VO₂ responses of patients with McArdle's disease. *J Appl Physiol* 1990; 68: 1393–1398
- Heller SL, Kaiser KK, Planer GL, Hagberg JM, Brooke MH. McArdle's disease with myoadenylate deaminase deficiency: observations in a combined enzyme deficiency. *Neurology* 1987; 37: 1039–1042
- Koike AM, Hiroe M, Adachi H, Yajima T, Nogami A, Ito H, Takamoto T, Taniguchi K, Marumo F. Anaerobic metabolism as an indicator of aerobic function during exercise in cardiac patients. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20: 120–126
- Lowenstein JM. Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. *Physiol Rev* 1972; 52: 382–414
- Lucia A, Hoyos J, Santalla A, Earnest C, Chicharro JL. Tour de France vs. Vuelta a España: which is harder? *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35: 872–878
- Lucia A, Maté-Muñoz JL, Pérez M, Gutierrez-Rivas E, Foster C, Arenas J. Double trouble (McArdle's disease and myasthenia gravis): how can exercise help? *Muscle Nerve* 2007; 35: 125–128
- Martin MA, Rubio JC, Buchbinder J, Fernandez-Hojas R, del Hoyo P, Teixeira S, Gámez J, Navarro C, Fernández JM, Cabello A, Campos Y, Cervera C, Culebras JM, Andreu AL, Fletterick R, Arenas J. Molecular heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease): a genotype-phenotype correlation study. *Ann Neurol* 2001; 50: 574–581
- Martinuzzi A, Sartori E, Fanin M, Nascimbeni A, Valente L, Angelini C, Siciliano G, Mongini T, Tonin P, Tomelleri G, Toscano A, Merlini L, Bindoff LA, Bertelli S. Phenotype modulators in myophosphorylase deficiency. *Ann Neurol* 2003; 53: 497–502
- Matsumura N, Nishijima H, Kojima S, Hashimoto F, Minami M, Yasuda H. Determination of anaerobic threshold for assessment of functional state in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1983; 68: 360–367
- Maxwell DL, Fuller RW, Nolop KB, Dixon CM, Hughes JM. Effects of adenosine on ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia in humans. *J Appl Physiol* 1986; 61: 1762–1766
- McArdle B. Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown. *Clin Sci* 1951; 10: 13–33
- Meyer T, Lucia A, Earnest CP, Kindermann W. A conceptual framework for performance diagnosis and training prescription from submaximal gas exchange parameters – theory and application. *Int J Sports Med* 2005; 26 (Suppl 1): S38–S48
- Morisaki T, Gross M, Morisaki H, Pongratz D, Zollner N, Holmes EW. Molecular basis of AMP deaminase deficiency in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6457–6661
- Norman B, Glenmark B, Jansson E. Muscle AMP deaminase deficiency in 2% of healthy population. *Muscle Nerve* 1995; 18: 239–241
- Norman B, Sabina RL, Jansson E. Regulation of skeletal muscle ATP catabolism by AMPD1 genotype during sprint exercise in asymptomatic subjects. *J Appl Physiol* 2001; 91: 258–264
- Pérez M, Martin MA, Cañete S, Rubio JC, Fernández-Moreira D, San Juan AF, Gómez-Gallego F, Santiago C, Arenas J, Lucia A. Does the C34T mutation in AMPD1 alter exercise capacity in the elderly? *Int J Sports Med* 2006; 27: 429–435
- Pérez M, Martin MA, Rubio JC, Maté-Muñoz JL, Gómez-Gallego F, Foster C, Andreu AL, Arenas J, Lucia A. Exercise capacity in a 78 year old patient with McArdle's disease: it is never too late to start exercising. *Br J Sports Med* 2006; 40: 725–726
- Rico-Sanz J, Rankinen T, Joannisse DR, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard C. Associations between cardiorespiratory responses to exercise and the C34T AMPD1 gene polymorphism in the HERITAGE family study. *Physiol Genomics* 2003; 14: 161–166
- Riley M, Nicholls DP, Nugent A-M, Steele IC, Bell N, Davies PM, Stanford CF, Patterson VH. Respiratory gas exchange and metabolic responses during exercise in McArdle's disease. *J Appl Physiol* 1993; 75: 745–754
- Rubio JC, Martin MA, Del hoyo P, Bautista J, Campos Y, Segura D, Navarro C, Rico J, Cabello A, Arenas J. Molecular analysis of Spanish patients with AMP deaminase deficiency. *Muscle Nerve* 2000; 23: 1175–1178
- Rubio JC, Nogales-Gadea G, Garcia-Consuegra I, Blázquez A, Cabello A, Lucia A, Andreu AL, Arenas J, Martin MA. A proposed molecular diagnosis flowchart for myophosphorylase deficiency (McArdle disease) in blood samples from Spanish patients. *Hum Mutat* 2007; 28: 203–204
- Tarnopolsky MA, Parise G, Gibala MJ, Graham TE, Rush JW. Myoadenylate deaminase deficiency does not affect muscle anaplerosis during exhaustive exercise in humans. *J Physiol* 2001; 533: 881–889
- Tsuji S, Shanske S, Dimauro S. Molecular genetic heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle disease). *N Engl J Med* 1993; 329: 241–245
- Vissing J, Haller RG. The effect of oral sucrose on exercise tolerance in patients with McArdle's disease. *N Engl J Med* 2003; 349: 2503–2509
- Winder WW. Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2001; 91: 1017–1028

3.3 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN EN EL GEN *PYGM*.

Artículo 5

Nogales-Gadea G*, **Rubio JC***, Fernandez-Cadenas I, Garcia-Consuegra I, Lucia A, Cabello A, Garcia-Arumi E, Arenas J, Andreu AL**, Martin MA**. ***Expression of the muscle glycogen phosphorylase gene in patients with McArdle disease: the role of nonsense-mediated mRNA decay.*** Hum Mutat. 2008 Feb;29(2):277-83.

* / ** Estos autores contribuyen por igual.

ARTÍCULO 5

Expression of the muscle glycogen phosphorylase gene in patients with McArdle disease: the role of nonsense-mediated mRNA decay. Hum Mutat. 2008 Feb;29(2):277-83.

Resumen

Aproximadamente el 35% de las mutaciones identificadas en el gen *PYGM* producen codones de terminación prematura (PTCs), concretamente la mutación p.R50X, que se encuentra en más del 50% de los alelos mutados en población caucásica. En esta publicación se pretendía averiguar la influencia del mecanismo de degradación del mRNA denominado "Nonsense Mediated decay" (NMD) en los niveles de los transcritos del gen *PYGM* que portan PTCs.

Para ello se realizaron estudios de secuenciación y de PCR a tiempo real en cDNA obtenido de músculo esquelético de 28 pacientes con enfermedad de McArdle. La serie estaba formada por 18 genotipos distintos procedentes de la combinación de 17 mutaciones diferentes, los cuales predecían la generación de PTCs en el 77% de los casos.

El mecanismo NMD fue observado en el 92% de los pacientes. La mutación p.R50X produjo NMD en todos los genotipos. Otras mutaciones terminadoras en las que posiblemente ocurrió NMD fueron: p.L5VfsX22, p.Q73HfsX7, p.E125X, p.N134KfsX161, p.W388SfsX34, p.R491AfsX7, y p.D534VfsX5. Las mutaciones de cambio de aminoácido no parecen verse afectadas por NMD. Se observó que algunas mutaciones concretamente, p.A704V y p.K754NfsX49 no cumplen las reglas generales que explican el mecanismo del NMD. Así, la mutación p.A704V no debería afectar a la estabilidad del mRNA, aunque no se pudo detectar el transcrito correspondiente al alelo que portaba dicha mutación. En este mismo sentido, la mutación terminadora, p.K754NfsX49, produjo transcritos que no se ven afectados por el NMD en los tres pacientes de la serie que portan esta mutación. Por último no se observó asociación entre el fenotipo clínico de los pacientes estudiados y el NMD.

Este estudio pone de relieve la importancia de los mecanismos de procesamiento del RNA en la patología molecular de la enfermedad de McArdle.

RESEARCH ARTICLE

Expression of the Muscle Glycogen Phosphorylase Gene in Patients With McArdle Disease: The Role of Nonsense-Mediated mRNA Decay

Gisela Nogales-Gadea,^{1,6} Juan Carlos Rubio,^{2,6} Israel Fernandez-Cadenas,³ Ines Garcia-Consuegra,^{2,6} Alejandro Lucia,⁴ Ana Cabello,^{5,6} Elena Garcia-Arumi,^{1,6} Joaquin Arenas,^{2,6} Antoni L. Andreu,^{1,6*} and Miguel A. Martín^{2,6}

¹Departament de Patologia Mitocondrial i Neuromuscular, Institut de Recerca, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ²Centro de Investigación, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ³Neurovascular Research Laboratory, Neurovascular Unit, Institut de Recerca, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ⁴Universidad Europea de Madrid, Madrid, Spain; ⁵Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ⁶Centre for Biomedical Research on Rare diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Barcelona, Spain

Communicated by Jan P. Kraus

Nearly 35% of all mutations identified in the muscle glycogen phosphorylase gene (PYGM) in patients with McArdle disease result in premature termination codons (PTCs), particularly the p.R50X mutation. The latter accounts for more than 50% of the mutated alleles in most Caucasian patient populations. Mutations resulting in PTC could trigger the degradation of mRNA through a mechanism known as nonsense mediated decay (NMD). To investigate if NMD affects the levels of transcripts containing PYGM mutations, 28 Spanish patients with McArdle disease, harboring 17 different mutations with PTCs in 77% of their alleles, were studied. Transcripts levels of PYGM were measured and sequenced. We assessed that 92% of patients showed NMD. The most frequent mutation (p.R50X) elicited decay in all the genotypes tested. Other PTC producing mutations resulting in NMD were: p.L5VfsX22, p.Q73HfsX7, p.E125X, p.N134KfsX161, p.W388SfsX34, p.R491AfsX7, and p.D534VfsX5. Located in the last exon, the mutation p.E797VfsX19 was not affected by NMD. Missense mutations did not appear to be affected by NMD. In the cDNA sequences they appeared as homozygous, despite being heterozygous in the genomic DNA sequences. Exceptions to the rules governing NMD were found in the mutations p.A704V and p.K754NfsX49. *Hum Mutat* 29(2), 277–283, 2008. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: McArdle disease; PYGM; NMD; myophosphorylase; glycogenosis type V

INTRODUCTION

Mutations in the human skeletal muscle isoform of the glycogen phosphorylase gene (PYGM, myophosphorylase; MIM# 608455) result in glycogen storage disease type V (McArdle disease, GSD-V; MIM# 232600), the most common glycogenolytic disorder in skeletal muscle. The human PYGM gene expands about 14.2 kb on chromosome 11q13 and contains 20 exons. It encodes for myophosphorylase, which initiates glycogen breakdown by removing alpha-1,4 glucosyl units phosphorolytically from the outer branches of glycogen with liberation of glucose-1-phosphate. The lack of functional mature protein results in the inability to obtain energy from skeletal glycogen deposits in patients with McArdle disease. The onset is usually in the second or third decade of life manifesting as exercise intolerance, i.e., premature fatigue and muscle weakness during exercise, which can be accompanied by myalgia and cramps. Exercise-induced myoglobinuria can also occur.

To date, more than 95 different mutations have been reported in patients with McArdle disease studied worldwide [Rubio et al., 2006a, 2006b; Aquaron et al., 2007; Deschauer et al., 2007; Nogales-Gadea et al., 2007]. The most common mutation identified in the Caucasian population is p.R50X, which results

in a premature termination codon (PTC). This nonsense mutation has an allelic frequency among patients with McArdle disease of 63% in North America [Bartram et al., 1994], 81% in England [el-Schahawi et al., 1996], 58% in Germany [Deschauer et al., 2007], 56 to 72% in France [Bruno et al., 2000; Aquaron et al., 2007], 52% in Spain [Rubio et al., 2006a], 43% in Italy [Bruno et al., 2006], and 31% in the Netherlands [Martin et al., 2003]. For the other mutations described in PYGM, the estimation is that

Received 13 June 2007; accepted revised manuscript 15 August 2007.

*Correspondence to: Antoni L. Andreu, Departament de Patologia Mitocondrial i Neuromuscular, Institut de Recerca, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Pg.Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. E-mail: aandreu@ir.vhebron.net

Grant sponsor: Spanish Network for Rare Diseases (CIBERER); Grant sponsor: Fondo de Investigación Sanitaria (FIS); Grant numbers: PI040487; PI041157; PI040362.

Gisela Nogales-Gadea, Juan Carlos Rubio, Antoni L. Andreu, and Miguel A. Martín contributed equally to this work.

DOI 10.1002/humu.20649

Published online 9 November 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

35% may generate a PTC [Rubio et al., 2006a, 2006b; Aquaron et al., 2007; Deschauer et al., 2007; Nogales-Gadea et al., 2007]. Though several mutations resulting in PTCs have been found in unrelated McArdle patients, including: p.E125X, p.R270X, and p.K754NfsX49, most nonsense and frameshift mutations are private, i.e., reported only in one patient or within the same family. These include p.E797VfsX19 [Martin et al., 2000], p.W388SfsX34 [Martin et al., 2001a], and p.D534VfsX5 [Martin et al., 2001b].

Nonsense and frameshift mutations that induce PTCs can destabilize mRNA transcripts in vivo [Kinniburgh et al., 1982; Leeds et al., 1991]. The RNA surveillance mechanism eliminating the majority of transcripts containing PTCs is the nonsense mediated mRNA decay (NMD). This mechanism is thought to protect the organism from the deleterious dominant negative or gain-of-function effects of truncated proteins that could result if nonsense transcripts were stable. Furthermore, NMD is a critical process for normal cellular development [Frischmeyer and Dietz, 1999; Mendell et al., 2004]. Reductions in the level of mutant mRNA transcripts have been associated with PTC mutations in the breast cancer 1 [Perrin-Vidoz et al., 2002], DNA polymerase gamma [Chan et al., 2005], carbamyl phosphate synthetase I [Eeds et al., 2006], iduronate 2-sulfatase [Lualdi et al., 2006], and acid beta-glucosidase [Montfort et al., 2006] genes. An experimentally defined rule in NMD indicates that PTCs occurring 50 to 55 nucleotides upstream of the 3' most exon-exon junction, mediate a reduction in mRNA abundance [Cheng et al., 1994; Nagy and Maquat, 1998; Zhang et al., 1998]. Exceptions to the rules governing the susceptibility to the NMD have, however, confirmed a wide variability in mRNA expression levels in several genetic diseases [Asselta et al., 2001; Danckwardt et al., 2002; Perrin-Vidoz et al., 2002; Denecke et al., 2004; Harries et al., 2005; Lualdi et al., 2006].

To assess the role of NMD in the transcriptome of McArdle disease, especially in those mutations producing PTCs, skeletal muscle cDNA of 28 patients was studied by sequencing and quantitative real-time PCR. A total of 18 different genotypes generated by the combination of 17 different mutations were studied. A total of 77% of the alleles had mutations producing PTCs. The distribution of these mutations along the PYGM coding region was used to assess a putative positional effect of PYGM mutations over the NMD mechanism. Some familial cases were included in the study to investigate the influence of genetic background on NMD.

MATERIALS AND METHODS

Subjects of Study

We studied 28 Spanish McArdle patients (Patients P1–P28) previously molecularly characterized [Martin et al., 2001b; Rubio et al., 2006a, 2006b]. In 27 of them, biochemical determination of myophosphorylase in the muscle biopsy showed undetectable enzyme activity and further confirmed the diagnosis. Only in Patient P21 were we not able to measure the enzyme activity due to the small amount of the tissue sample. Seven muscle biopsies from healthy individuals were used as controls (C1–C7). Written consent was obtained from all individuals. The study was approved by the institutional review board (Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain) and was in accordance with the Declaration of Helsinki for Human Research.

Molecular genetic analysis allowed the identification of 17 mutations in the PYGM coding sequence (see Table 1). All patients were unrelated, except two pairs of siblings (Patients

P12–P13 and P17–P18). In all cases PYGM mutations were identified except in two patients (Patients P27 and P28), in whom only one heterozygous mutation was found after sequencing the complete coding region. Mutations identified in cDNA are indicated by a “c.” with numbering based on +1 as the A of the ATG initiation codon (codon +1) and the protein translation product is indicated by a “p.” (www.hgvs.org/mutnomen) [den Dunnen and Paalman, 2003]. GenBank reference sequences were NM_005609.1 and NP_005600.1 for cDNA and protein, respectively.

cDNA Synthesis

Total RNA was extracted from the skeletal muscle samples using Totally RNATM (Ambion, Austin, TX; www.ambion.com). RNA was treated with the deoxyribonuclease I, amplification grade (Invitrogen, Carlsbad, CA; www.invitrogen.com) to eliminate any traces of DNA. RNA concentration and quality was measured with NanoChips using the Bioanalyzer 2100 system and the 2100 Expert Software version B.02.02 (Agilent, Santa Clara, CA; www.agilent.com) for the analysis. Muscle cDNA was synthesized using the high-capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA; www.appliedbiosystems.com).

Transcriptomic Analysis of PYGM

Sequencing. PYGM muscle cDNA was amplified by PCR in two overlapping fragments, by using the following primers: a 1,489-bp fragment (1F:5'-TCCACTCCTTGGCTGGAG-3', and 1R:5'-TTTGAAGATGGTCTTCTTGAGG-3') and a 1,520-bp fragment (2F:5'-GACAAGGCGTGGGATGTG-3', and 2R:5'-CCTCTGCATGAGGTGCTG-3'). A 1,200-bp fragment in the porphobilinogen deaminase gene (PBGD) was amplified as a control (C1F:5'-AGTGTGGTGGCAACATTGAA-3', and C1R:5'-GGCTGTTGCTTGGACTIONCTC-3'). PCR conditions were 35 cycles consisting of denaturation at 94°C for 30 s, annealing for 30 s (59°C, 64°C, and 60°C, for first PYGM fragment, second PYGM fragment and PBGD fragment, respectively) and extension 72°C for 1 min and 30 s. Initial denaturation at 94°C was performed for 5 min, and a final extension at 72°C for 10 min. The PYGM and PBGD fragments were run in 1.5% agarose gel. For sequencing the PYGM fragments, eight internal primers in an Applied Biosystem 3100 automated DNA sequencer were used, following the manufacturer's protocol.

Real-Time PCR analysis. The PYGM mRNA levels were quantitated by real-time PCR, using TaqMan fluorogenic probes and a 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). A probe located in exons 6–7 (Hs00194493_m1) was used in all samples; while probes between exons 1–2 (Hs00989945_m1) and exons 17–18 (Hs00989942_m1) were used to test putative differences in the levels of expression related to the location of the probe. Cyclophilin A (PPIA) expression (Hs009999904_m1) was used to normalize the results. Real-time PCR was performed using a standard TaqMan[®] PCR kit protocol consisting of 20 µl PCR mix including 5 µl cDNA, 10 µl 2 × TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (P/N: 4304437; Applied Biosystems), 1 µl of Taqman gene expression assay, and 4 µl of water. Reactions were performed in a 96-well plate at 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. All reactions were run in triplicate and analyzed using the Applied Biosystems SDS 7500 system software (Applied Biosystems). All the expression values were recalculated considering 100% the average of the results obtained in the control samples.

TABLE 1. Transcriptional Profile of 28 Patients With McArdle Disease[†]

Patient	PTCs	Type	Genomic PYGM alleles	Predicted amino acid change	Mutations in the cDNA	Real-time (%)
P1	0	MS/MS	c.2392T>C/c.2392T>C	p.W798R/p.W798R	p.W798R D	56
P2	1	MS/FS	c.580C>T/c.2385_2386delAA	p.R194W/p.E797VfsX19	p.R194W D/ p.E797VfsX19	73
P3	1	NS/MS	c.148C>T/c.280C>T	p.R50X/ p.R94W	p.R50X ND/ p.R194W D*	41
P4	1	NS/MS	c.148C>T/c.613G>A	p.R50X/ p.G205S	p.R50X ND/ p.G205S D*	81
P5	1	NS/MS	c.148C>T/c.613G>A	p.R50X/ p.G205S	p.R50X ND/ p.G205S D*	34
P6	1	NS/MS	c.148C>T/c.1804C>T	p.R50X/ p.R602W	p.R50X ND/ p.R602W D*	37
P7	1	NS/MS	c.148C>T/c.1979C>A	p.R50X/ p.A660D	No Amp	45
P8	1	NS/MS	c.148C>T/c.2111C>T	p.R50X/ p.A704V	No Amp	1
P9	1	NS/MS	c.148C>T/c.2392T>C	p.R50X/ p.W798R	p.R50X ND/ p.W798R D*	71
P10	1	NS/MS	c.148C>T/c.2392T>C	p.R50X/ p.W798R	p.R50X ND/ p.W798R D*	36
P11	2	FS/FS	c.402delC/c.1470dupG	p.N134KfsX161/ p.R491AfsX7	No Amp	3
P12	2	FS/FS	c.1162_1169delTTGGCCGGTinsA/c.2262delA	p.W388SfsX34/ p.K754NfsX49	p.W388SfsX34/ p.K754NfsX49 D*	32
P13	2	FS/FS	c.1162_1169delTTGGCCGGTinsA/c.2262delA	p.W388SfsX34/ p.K754NfsX49	p.W388SfsX34/ p.K754NfsX49 D*	30
P14	2	NS/FS	c.148C>T/c.13_14delCT	p.R50X/ p.L5VfsX22	No Amp	5
P15	2	NS/FS	c.148C>T/c.13_14delCT	p.R50X/ p.L5VfsX22	No Amp	4
P16	2	NS/FS	c.148C>T/c.212_218dupCGCAGCA	p.R50X/ p.Q73HfsX7	No Amp	1
P17	2	NS/FS	c.148C>T/c.1601delA	p.R50X/ p.D534VfsX5	No Amp	1
P18	2	NS/FS	c.148C>T/c.1601delA	p.R50X/ p.D534VfsX5	No Amp	2
P19	2	NS/FS	c.148C>T/c.2262delA	p.R50X/ p.K754NfsX49	p.R50X ND/ p.K754NfsX49 D*	45
P20	2	NS/NS	c.148C>T/c.148C>T	p.R50X/ p.R50X	No Amp	1
P21	2	NS/NS	c.148C>T/c.148C>T	p.R50X/ p.R50X	No Amp	1
P22	2	NS/NS	c.148C>T/c.148C>T	p.R50X/ p.R50X	No Amp	1
P23	2	NS/NS	c.148C>T/c.148C>T	p.R50X/ p.R50X	No Amp	1
P24	2	NS/NS	c.148C>T/c.148C>T	p.R50X/ p.R50X	No Amp	2
P25	2	NS/NS	c.148C>T/c.148C>T	p.R50X/ p.R50X	No Amp	3
P26	2	NS/NS	c.373G>T/c.373G>T	p.E125X/ p.E125X	No Amp	1
P27	At least 1	FS/-	c.2262delA/-	p.K754NfsX49/-	p.K754NfsX49 ND/-	79
P28	At least 1	NS/-	c.148C>T/-	p.R50X/-	p.R50X ND	50

[†]The patients are organized by the number of PTCs that PYGM mutations generate. At least one means that we have just found one mutation in the patient and that mutation causes a PTC. "Type" means type of mutation: missense (MS), nonsense (NS), frameshift (FS), no additional mutation found after sequencing the PYGM coding sequence (-). Mutations are numbered after journal specifications (www.hgvs.org/mutnomen) [den Dunnen and Paalman, 2003]. The GenBank reference sequence for cDNA is NM_005609.1 and for the protein NP_005609.1. Mutations found in the cDNA are described as: detected (D), not detected (ND), no amplification or very reduced amplification insufficient to sequence (No Amp); there is no detection of the other allele and the mutation appears to be homozygous in the cDNA sequence (*). Real-time PCR values are given as percentages; each individual sample was compared with the average of the control values, considered 100%.

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was performed using the SPSS package (SPSS, Chicago, IL). The Kruskal-Wallis test was used to analyze for differences in PYGM mRNA levels among groups (controls, patients with one PTC, patients with two PTCs), and Mann Whitney's U-test was used to analyze differences between two groups.

RESULTS

A total of 17 mutations in the PYGM gene were assessed for a putative NMD effect, including five different types of mutation: point mutations, nonsense, and missense mutations (p.R50X, p.R94W, p.E125X, p.R194W, p.G205S, p.R602W, p.A660D, p.A704V, and p.W798R); deletions (p.L5VfsX22, p.N134KfsX161, p.D534VfsX5, and p.K754NfsX49); duplications (p.Q73HfsX7 and p.R491AfsX7); and insertions/deletions (p.W388SfsX34 and p.E797VfsX19). The different distribution of the mutations was appropriate to evaluate the positional effect of the NMD mechanism along the PYGM gene. Fig. 1 shows the PCR products of PYGM and PBGD amplification for the cDNA of three patients who had a different number of PTCs. We observed similar amplification levels in the patient with no PTCs (Patient P1, missense/missense genotype) and in the control, lower amplification in the patient with one PTC (Patient P3, nonsense/missense genotype), and no amplification in the patient with two PTCs (Patient P22, nonsense/nonsense genotype). This effect was not observed in the endogenous control gene, with similar amplification in the samples with different PTC number.

Sequencing

The mutation effect of each allele in the PYGM mRNA was evaluated by sequencing the mutation in the cDNA. In general, we found three main transcriptional behaviors (Table 1). First, in the patient with no PTCs we were able to detect in the cDNA sequence the genomic mutation (p.W789R); second, in patients containing one mutation producing a PTC and a missense mutation, only the missense mutation was found in the cDNA sequence, despite being heterozygous in the DNA (data not shown). The mutations causing the PTCs were not found in the cDNA sequences; and third, in most of the patients with two mutations producing a PTC we could not amplify the PYGM cDNA and in a small number of cases, we could amplify a small amount of product but it was insufficient to sequence.

Some mutations had a different effect in the PYGM PCR amplification. These were two missense mutations (p.A660D and p.A704V) whose transcripts failed to be amplified, and two mutations producing PTCs in which we had amplification

(p.K754NfsX49 and p.E797VfsX19). The p.K754Nfs49 was detected in the sequences of three patients (Patients P12, P13, and P19) and could not be detected in the sequence of a fourth patient (Patient P27).

Real-Time PCR Analysis

Initially PYGM expression was analyzed in 16 samples using three different probes located in different exon boundaries (exons 1–2, exons 6–7, and exons 17–18), to establish whether the expression depends on the probe location. No differences were found among the different probes (data not shown) and the exon 6–7 probe was used for the study. The studied subjects were distributed in three groups: controls, patients with one PTC, and patients with two PTCs. The results are represented in a scatter-plot diagram (Fig. 2). All the combinations showed significant differences ($P < 0.001$; Mann Whitney's U-test). Also the PYGM mRNA levels among groups were significantly different ($P < 0.001$; Kruskal-Wallis test).

The patient with no PTCs showed a PYGM expression of 56% of the control group expression. Patients with one PTC had PYGM mRNA expression values of 34 to 81%. Most patients with two PTCs had undetectable PYGM mRNA expression values (1–5%).

There were some particular cases not accomplishing the aforementioned general trends but their results were consistent with the sequencing data reported previously. The missense p.A704V mutation (Patient P8) with PYGM expression values of 1% and three patients harboring two PTCs (Patients P12, P13, and P19) with PYGM expression values ranging from 30 to 45%.

DISCUSSION

It has been established that approximately one-third of mutations underlying human disorders result in PTC, and therefore undergoing NMD [Correa-Cerro et al., 2005; Frischmeyer and Dietz, 1999]. Patients with McArdle disease are specially suitable to study the NDM mechanism in vivo, given that the most frequent mutation in PYGM, the nonsense mutation p.R50X, has a frequency above 50% in most Caucasian patients. Furthermore, among mutations other than p.R50X, approximately 35% generate PTCs [Rubio et al., 2006a, 2006b; Aquaron et al., 2007; Deschauer et al., 2007; Nogales-Gadea et al., 2007]. We have addressed the contribution of each mutated allele in the NMD mechanism by asking whether both, one, or none of the mutated transcripts were present in the skeletal muscle transcriptome. We have shown that this mechanism participates in 26 of the 28 Spanish McArdle patients studied, i.e., in 92% of our patient series, reflecting the molecular importance of this mechanism in this disease.

We have demonstrated that PYGM mutations are consistent with the accepted requirements of NMD. The action of NMD on the mRNAs would effectively remove all mature messages containing stop codons resulting in the actual expression of missense alleles only. By sequencing and real-time PCR we detected the presence of the missense mutations: p.R94W, p.R194W, p.G205S, p.R602W, and p.W798R. Due to the low RNA integrity of the sample with the p.A660D missense mutation, we could not amplify the PYGM PCR fragments of approximately 1.5 kb, through we could detect, by real-time PCR, PYGM expression values in the 67-bp amplicon. The most tested mutation of this series, the most common p.R50X mutation (allelic frequency 50% of the total), elicits NMD in all the genotypes studied. We were also able to demonstrate existence of NMD in the following PTC producing PYGM

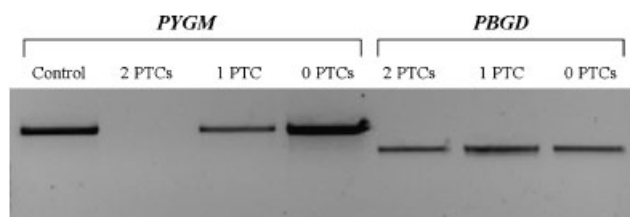


FIGURE 1. Agarose electrophoresis of the second PYGM fragment and PBGD fragment after PCR amplification. The first well corresponds to the PYGM second fragment amplification in a control subject. 2 PTCs refers to Patient P22, 1 PTC refers to Patient P3, and 0 PTCs refers to Patient P1.

mutations: p.L5VfsX22, p.Q73HfsX7, p.E125X, p.N134KfsX161, p.W388SfsX34, p.R491AfsX7, and p.D534VfsX5. We did observe a correlation between cDNA appearance and the distance of the PTC from the end of the transcript. As expected, the p.E797VfsX19 creates an aberrant stop codon in the terminal exon and bypasses NMD controls. This is consistent with previous observations that aberrant stop codons only elicit NMD when located at least 50 bp upstream of the most 3' terminal exon–exon junction [Cheng et al., 1994; Nagy and Maquat, 1998; Zhang et al., 1998].

The PYGM mutations' extended distribution through the entire 2,529-bp coding region shows the interesting effect of some mutations not entirely following NMD governing rules (Fig. 3). The p.K754NfsX49 produced transcripts evading mRNA surveillance pathway in three patients (Patients P12, P13, and P19) despite meeting the known criteria for NMD. As an example, PTC

mutations bypassing the RNA surveillance mechanism have been reported in apolipoprotein B transcripts with a PTC mutation, located upstream of three (splicing-generated) exon–exon junctions that failed to result in NMD [Chester et al., 2003]. The fact that in one of our patients (Patient P27) p.K754NfsX49 was not detectable suggests that the downregulation is not allelic-specific for this mutation. The p.A704V mutation is neither a frameshift mutation nor a nonsense mutation. This change is not expected to hinder the splicing and therefore would not affect RNA stability. However, we were not able to detect transcripts by both sequencing and real-time PCR, despite the good integrity of the RNA in the sample. We suggest that p.A704V mutation might produce new marks in the transcript, which could be detected by a mechanism inducing mRNA degradation. This observation is consistent with previous results by Eeds et al. [2006], who reported two patients carrying carbamyl phosphate synthetase I

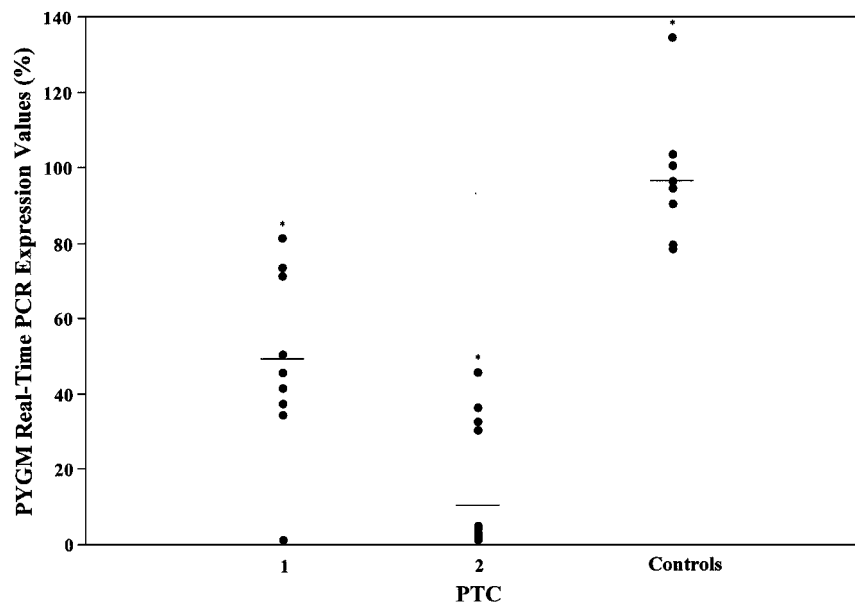
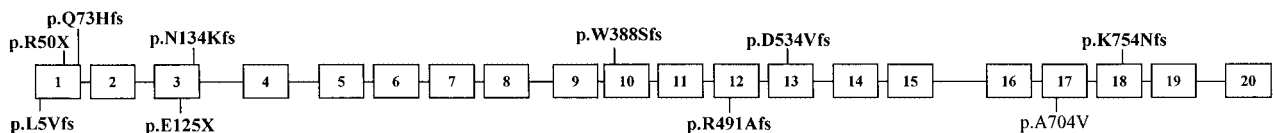


FIGURE 2. Scatter-plot diagram of *PYGM* real-time PCR expression values in groups of one PTC, two PTCs, and controls. Each individual is represented by a circle and a line indicates the group mean. *Statistically significant ($P < 0.001$) by the Kruskal-Wallis test.

Mutations in *PYGM* gene eliciting NMD



Mutations in *PYGM* gene bypassing NMD

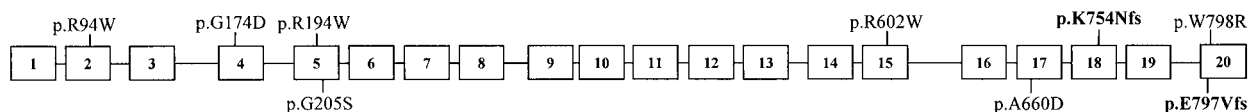


FIGURE 3. *PYGM* mutations eliciting and bypassing NMD. Open boxes represent the 20 exons of the *PYGM* gene. Mutations producing PTC are in bold. The p.A704V is the only missense mutation that elicits NMD. The p.K754Nfs mutation has a paradoxical effect, because it bypasses NMD in some patients and it elicits NMD in others.

(CPSI) missense mutations that elicited decay. In that study, the authors concluded that the two CPSI mutations might affect splicing through disruption of exon splicing enhancers and subsequently to result in mRNA degradation. Also in Patient P1, who was homozygous for the p.W798R mutation, we observed PYGM expression levels of 56% though expression values similar to that of the controls were theoretically expected.

Previous results have indicated that transcriptional profiles among patients bearing the same mutations are much more similar than those observed in patients carrying different mutations, indicating that the mutation itself is the main determinant [Pros et al., 2006]. A small part of the variability has been attributed to genetic background and other nongenetic factors such as age, hormonal status, therapeutic treatments, viral infections, environmental factors, and methodological aspects. To evaluate the importance of mutation and individual genetic variability in determining a particular PYGM-transcriptional profile, we have included six repeated genotypes of familial [p.W388SfsX34/p.K754NfsX49 (Patients P12 and P13) and p.R50X/p.D534VfsX5 (Patients P17 and P18)] and nonfamilial patients [p.R50X/p.G205S (Patients P4 and P5), p.R50X/p.W798R (Patients P12 and P13), p.R50X/p.L5VfsX22 (Patients P14 and P15), and p.R50X/p.R50X (Patients P20–P25)]. However, patients harboring a genotype leading to NMD could not be compared (these include: Patients P14, P15, P17, P18, P20, P21, P22, P23, P24, and P25) as mRNA levels were undetectable. Furthermore, our data suggests that the genetic background has a strong influence on the transcriptional profile. Such is the case of sibling patients (Patients P12 and P13) with transcriptional values of 30% and 32%. On the other hand, unrelated patients carrying p.R50X/p.G205S (Patients P4 and P5) and p.R50X/p.W798R (Patients P9 and P10) had important differences in levels of transcripts. Evidence of variability in transcriptional profiles come from comparing subjects with the same genotype: expression levels in some patients almost doubled those in some others. Considering that this has been shown in a small number of patients, our results suggest that besides the mutational effect, the transcriptional profile is significantly modified by other still unknown factors.

Our study highlights once more the importance of RNA processing defects in the molecular pathology. However, patients being homozygous for the p.R50X mutation, which undergoes NMD, show a similar phenotype to patients with missense mutations and normal transcriptional expression. This fact supports the complexity of seemingly “simple” monogenic mendelian disorders. A close examination of the molecular basis of the disease is becoming increasingly important for developing effective therapeutic approaches [Lualdi et al., 2006]. These include the possibility of pharmacologically suppressing nonsense codon recognition in NMD. Aminoglycosides are antibiotics that can prompt ribosomes to read-through PTCs, thereby generating full-length proteins and they have been proposed for suppressing PTCs in many diseases such as cystic fibrosis (CF), Duchenne muscular dystrophy (DMD), Becker muscular dystrophy, Hurler syndrome, late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, X-linked nephrogenic diabetes insipidus, cystinosis, polycystic kidney disease, and recessive spinal muscular atrophy [Kuzmiak and Maquat, 2006]. However, preliminary trials using aminoglycosides have not been successful [Keeling et al., 2006]. More promising results have been obtained using a recently developed drug, PTC124, that ignores PTCs like aminoglycosides but lacks its adverse side effects. PTC124 partially restores the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator production and physiology

in mouse models of CF [Welch et al., 2007]. McArdle patients are specially suitable for this therapeutical approach because of: 1) high participation of NMD in patients; 2) high incidence of the in-frame nonsense mutation, p.R50X; and 3) the low myophosphorylase activity threshold between 20 and 40% [Martinuzzi et al., 1996]. Nevertheless, the main disadvantage of this approach is that the effects of the chronic PTC read-through on the patients still remain unknown.

ACKNOWLEDGMENTS

G.N.-G. was supported by a fellowship from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (PI04/0362), Instituto de Salud Carlos III. I.G.-C. was supported by a fellowship from FIS (PI04/0487). R.-J.C. was supported by a contract from FIS (CA05-0039).

REFERENCES

- Aquaron R, Berge-LeFranc JL, Pellissier JE, Montfort ME, Mayan M, Figarella-Branger D, Coquet M, Serratrice G, Pouget J. 2007. Molecular characterization of myophosphorylase deficiency (McArdle disease) in 34 patients from Southern France: identification of 10 new mutations. Absence of genotype-phenotype correlation. *Neuromuscul Disord* 17:235–241.
- Asselta R, Duga S, Spena S, Santagostino E, Peyvandi F, Piseddu G, Targhetta R, Malcovati M, Mannucci PM, Tenchini ML. 2001. Congenital afibrinogenemia: mutations leading to premature termination codons in fibrinogen A alpha-chain gene are not associated with the decay of the mutant mRNAs. *Blood* 98:3685–3692.
- Bartram C, Edwards RH, Clague J, Beynon RJ. 1994. McArdle's disease: a rare frameshift mutation in exon 1 of the muscle glycogen phosphorylase gene. *Biochim Biophys Acta* 1226:341–343.
- Bruno C, DiMauro S, Lombes A, Aquaron R. 2000. Molecular study in a large series of French patients with McArdle's disease. *J Neurol* 274:120–121.
- Bruno C, Cassandrini D, Martinuzzi A, Toscano A, Moggio M, Morandi L, Servidei S, Mongini T, Angelini C, Musumeci O, Comi GP, Lamperti C, Filosto M, Zara F, Minetti C. 2006. McArdle disease: the mutation spectrum of PYGM in a large Italian cohort. *Hum Mutat* 27:718.
- Chan SS, Longley MJ, Naviaux RK, Copeland WC. 2005. Mono-allelic POLG expression resulting from nonsense-mediated decay and alternative splicing in a patient with Alpers syndrome. *DNA Repair* 4:1381–1389.
- Cheng J, Belgrader P, Zhou X, Maquat LE. 1994. Introns are cis effectors of the nonsense-codon-mediated reduction in nuclear mRNA abundance. *Mol Cell Biol* 14:6317–6325.
- Chester A, Somasekaram A, Tzimina M, Jarmuz A, Gisbourne J, O'Keefe R, Scott J, Navaratnam N. 2003. The apolipoprotein B mRNA editing complex performs a multifunctional cycle and suppresses nonsense-mediated decay. *EMBO J* 22:3971–3982.
- Correa-Cerro LS, Wassif CA, Wayne JS, Krakowiak PA, Cozma D, Dobson NR, Levin SW, Anadiotis G, Steiner RD, Krajewska-Walasek M, Nowaczyk MJ, Porter FD. 2005. DHCR7 nonsense mutations and characterisation of mRNA nonsense mediated decay in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet* 42:350–357.
- Danckwardt S, Neu-Yilik G, Thermann R, Frede U, Hentze MW, Kulozik AE. 2002. Abnormally spliced beta-globin mRNAs: a single point mutation generates transcripts sensitive and insensitive to nonsense-mediated mRNA decay. *Blood* 99:1811–1816.
- den Dunnen JT, Paalman MH. 2003. Standardizing mutation nomenclature: why bother?. *Hum Mutat* 22:181–182.
- Denecke J, Kranz C, Kemming D, Koch HG, Marquardt T. 2004. An activated 5' cryptic splice site in the human ALG3 gene generates a premature termination codon insensitive to nonsense-mediated mRNA decay in a new case of congenital disorder of glycosylation type Id (CDG-Id). *Hum Mutat* 23:477–486.
- Deschauer M, Morgenroth A, Joshi PR, Glaser D, Chinnery PF, Aasly J, Schreiber H, Knappe M, Zierz S, Vorgerd M. 2007. Analysis of spectrum

- and frequencies of mutations in McArdle disease: identification of 13 novel mutations. *J Neurol* 254:797–802.
- Eeds AM, Hall LD, Yadav M, Willis A, Summar S, Putnam A, Barr F, Summar ML. 2006. The frequent observation of evidence for nonsense-mediated decay in RNA from patients with carbamyl phosphate synthetase I deficiency. *Mol Genet Metab* 89:80–86.
- el-Schahawi M, Tsujino S, Shanske S, DiMauro S. 1996. Diagnosis of McArdle's disease by molecular genetic analysis of blood. *Neurology* 47:579–580.
- Frischmeyer PA, Dietz HC. 1999. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* 8:1893–1900.
- Harries LW, Bingham C, Bellanne-Chantelot C, Hattersley AT, Ellard S. 2005. The position of premature termination codons in the hepatocyte nuclear factor-1 beta gene determines susceptibility to nonsense-mediated decay. *Hum Genet* 118:214–224.
- Keeling KM, Du M, Bedwell DM. 2006. Therapies of nonsense-associated diseases. In: Maquat LE, editor. *Nonsense-mediated mRNA decay*. New York: Landes Bioscience. p 121–136.
- Kinniburgh AJ, Maquat LE, Schedl T, Rachmilewitz E, Ross J. 1982. mRNA-deficient beta o-thalassemia results from a single nucleotide deletion. *Nucleic Acids Res* 10:5421–5427.
- Kuzmiak HA, Maquat LE. 2006. Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med* 12:306–316.
- Leeds P, Peltz SW, Jacobson A, Culbertson MR. 1991. The product of the yeast UPF1 gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev* 5:2303–2314.
- Lualdi S, Di Rocco M, Corsolini F, Spada M, Bembì B, Cotugno G, Battini R, Stroppiano M, Gabriela Pittis M, Filocamo M. 2006. Identification of nine new IDS alleles in mucopolysaccharidosis II. Quantitative evaluation by real-time RT-PCR of mRNAs sensitive to nonsense-mediated and nonstop decay mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1762:478–484.
- Martin MA, Rubio JC, Campos Y, Vilchez J, Cabello A, Arenas J. 2000. Two homozygous mutations (R193W and 794/795 delAA) in the myophosphorylase gene in a patient with McArdle's disease. *Hum Mutat* 15:294.
- Martin MA, Rubio JC, Garcia A, Fernandez MA, Campos Y, Krawczak M, Cooper DN, Arenas J. 2001a. Resolution of a mispaired secondary structure intermediate could account for a novel micro-insertion/deletion (387 insA/del 8bp) in the PYGM gene causing McArdle's disease. *Clin Genet* 59:48–51.
- Martin MA, Rubio JC, Buchbinder J, Fernandez-Hojas R, del Hoyo P, Teixeira S, Gamez J, Navarro C, Fernandez JM, Cabello A, Campos Y, Cervera C, Culebras JM, Andreu AL, Fletterick R, Arenas J. 2001b. Molecular heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease): a genotype-phenotype correlation study. *Ann Neurol* 50:574–581.
- Martin MA, Rubio JC, Wevers RA, Van Engelen BMG, Steenbergen GCH, Van Diggelen OP, De Visser M, De Die-Smulders C, Blazquez A, Andreu AL, Arenas J. 2003. Molecular analysis of myophosphorylase deficiency in Dutch patients with McArdle's disease. *Ann Hum Genet* 68:17–22.
- Martinuzzi A, Tsujino S, Vergani L, Schievano G, Cadaldini M, Bartoloni L, Fanin M, Siciliano G, Shanske S, DiMauro S, Angelini C. 1996. Molecular characterization of myophosphorylase deficiency in a group of patients from northern Italy. *J Neurol Sci* 137:14–19.
- Mendell JT, Sharifi NA, Meyers JL, Martinez-Murillo F, Dietz HC. 2004. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat Genet* 36:1073–1078.
- Montfort M, Chabas A, Vilageliu L, Grinberg D. 2006. Analysis of nonsense-mediated mRNA decay in mutant alleles identified in Spanish Gaucher disease patients. *Blood Cells Mol Dis* 36:46–52.
- Nagy E, Maquat LE. 1998. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* 23:198–199.
- Nogales-Gadea G, Arenas J, Andreu AL. 2007. Molecular genetics of the McArdle's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7:84–92.
- Perrin-Vidoz L, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Lenoir GM, Mazoyer S. 2002. The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Hum Mol Genet* 11:2805–2814.
- Pros E, Larriba S, Lopez E, Ravella A, Gili ML, Kruyer H, Valls J, Serra E, Lazaro C. 2006. NF1 mutation rather than individual genetic variability is the main determinant of the NF1-transcriptional profile of mutations affecting splicing. *Hum Mutat* 27:1104–1114.
- Rubio JC, Garcia-Consuegra I, Nogales-Gadea G, Blazquez A, Cabello A, Lucia A, Andreu AL, Arenas J, Martin MA. 2006a. A proposed molecular diagnostic flowchart for myophosphorylase deficiency (McArdle disease) in blood samples from Spanish patients. *Hum Mutat* 28:203–204.
- Rubio JC, Lucia A, Fernandez-Cadenas I, Cabello A, Blazquez A, Gamez J, Andreu AL, Martin MA, Arenas J. 2006b. A novel mutation in the PYGM gene resulting in McArdle's disease. *Arch Neurol* 63:1782–1784.
- Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen G, Jones S, Ren H, Moon YC, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Hirawat S, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrick P, He F, Kawana M, Feng H, Jacobson A, Peltz SW, Sweeney HL. 2007. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447:87–91.
- Zhang J, Sun X, Qian Y, LaDuca JP, Maquat LE. 1998. At least one intron is required for the nonsense-mediated decay of triosephosphate isomerase mRNA: a possible link between nuclear splicing and cytoplasmic translation. *Mol Cell Biol* 18:5272–5283.

4. DISCUSIÓN

La enfermedad de McArdle (Glucogenosis tipo V, GSD V; MIM # 232600) es una miopatía metabólica causada por un defecto en el gen que codifica la forma muscular del enzima Glucógeno Fosforilasa (Miofosforilasa *PYGM*; α -1,4-glucan ortofosfato glucosiltransferasa; EC 2.4.1.1) (Nogales-Gadea, et al., 2007). Se caracteriza por la aparición de manifestaciones clínicas en la segunda o tercera década de vida y cursa con un cuadro de intolerancia al ejercicio con fatiga prematura, mialgias, calambres y en algunas ocasiones mioglobinuria. La aparición de la intolerancia al ejercicio en las primeras fases de la actividad física puede considerarse como una especie de señal de alarma que indica la necesidad de detener la misma. Este hecho sirve de diagnóstico diferencial con respecto al déficit de carnitina palmitoil transferasa II, que también produce un cuadro de intolerancia al ejercicio, si bien en los pacientes con esta enfermedad no existe la inicial sensación de incapacidad para realizar el ejercicio y la presencia de rabdomiolisis y mioglobinuria es por tanto más frecuente (Arenas and Martin, 2003).

En general existen dos tipos de ejercicios que desencadenan la sintomatología, los de tipo *anaeróbico*, que son breves pero de alta intensidad, como levantar pesas y los de tipo *aeróbico*, que son de menor intensidad pero de mayor duración, como montar en bicicleta.

La mayoría de los pacientes presentan el fenómeno denominado “segundo aliento”, que supone la utilización de otras rutas metabólicas alternativas para la obtención de ATP, tales como utilización de ácidos grasos y la oxidación de aminoácidos (Haller and Vissing, 2002).

4.1 HETEROGENEIDAD Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

Una de las características más evidentes de la enfermedad de McArdle es la heterogeneidad molecular. Hasta la fecha de elaboración de esta tesis se han identificado más de 100 mutaciones diferentes en el gen *PYGM*, que afectan tanto a zonas codificantes como no codificantes. Se han descrito mutaciones terminadoras, mutaciones con cambio de aminoácido, mutaciones que afectan al corte y empalme de exones, deleciones, inserciones, etc.

En la serie de 55 pacientes españoles estudiados en esta tesis (28 hombres y 27 mujeres) con inicio de los síntomas entre 8 y 59 años (edad de diagnóstico entre 10 y

70 años), se ha confirmado dicha heterogeneidad molecular. Se han encontrado 21 mutaciones diferentes: 11 descritas previamente en la literatura (p.R50X, p.R94W, p.G205S, p.R576X, p.R602W, p.K609K, p.A660D, p.A704V, p.K754NfsX49, p.W798R, c.1768 +1G>A) (Andreu, et al., 1999; Deschauer, et al., 2003; Gamez, et al., 1999; Gamez, et al., 2003; Kubisch, et al., 1998; Martin, et al., 2001a; Martin, et al., 2000a; Rubio, et al., 2000a; Tsujino, et al., 1993; Tsujino, et al., 1994b; Vorgerd, et al., 1998) y 10 nuevas mutaciones: p.L5VfsX22, p.Q73HfsX7, p.I83F, p.N134KfsX161, p.G174D, p.A365V, p.R490W, p.R491AfsX7, p.Q577R, p.C784X (Rubio, et al., 2007a; Rubio, et al., 2006). De las 21 mutaciones indicadas anteriormente 8 producen directa o indirectamente un codón prematuro de terminación (PTC), 11 son mutaciones con cambio de aminoácido, y 2 afectan al mecanismo de corte y empalme de exones. De las nuevas mutaciones descritas, 6 se encuentran en la zona N-terminal (comprende desde el residuo 1 hasta el 482) que contiene la mayoría de los residuos de unión a ligandos, y la mayor parte de los residuos que entran en contacto con residuos del otro monómero (residuos de contacto entre dímeros); y 4 se encuentran en el extremo C-terminal (residuo 483 hasta el 842), que contiene la mayoría de los residuos del centro activo y los implicados en la unión al piridoxal fosfato (Hudson, et al., 1993), por lo qué la distribución de las mutaciones encontradas afecta de igual manera a ambos dominios.

La mutación terminadora p.R50X es la más prevalente en los diferentes grupos de poblaciones donde se ha observado, representando el 81% de los alelos mutados en pacientes del Reino Unido (Bartram, et al., 1994), el 64% en Estados Unidos (el-Schahawi, et al., 1996), el 56% en Alemania (Vorgerd, et al., 1998), el 43% en Italia (Bruno, et al., 2006), el 31 % en los de Holanda (Martin, et al., 2004), el 72% en Francia (Aquaron, et al., 2007) y entre el 47% y el 55% en estudios previos en España (Andreu, et al., 1998; Martin, et al., 2001a).

La segunda mutación más frecuente descrita en el gen *PYGM* es la mutación con cambio de aminoácido p.G205S que representa el 10% de alelos en pacientes americanos y 9% de alelos en pacientes españoles (Martin, et al., 2001a; Tsujino, et al., 1993). Sin embargo, tanto la mutación p.R50X como la p.G205S no se han encontrado nunca en pacientes japoneses.

La mutación con cambio de aminoácido p.W798R se ha encontrado en el 14% de los alelos de los pacientes españoles estudiados. Esta alteración particular de población

española (Fernandez, et al., 2000; Martin, et al., 2001a) (mutación privada) es además la segunda más frecuente en esta población.

Teniendo en cuenta los datos de los 55 nuevos pacientes españoles incluidos en esta tesis (Rubio, et al., 2007a), más aquellos de los 40 analizados previamente por nuestro grupo (Martin, et al., 2001a), el análisis molecular y la distribución alélica de los 95 pacientes muestra las siguientes evidencias: *i*) la mutación p.R50X es la más común en población española, representando el 68,4% de los pacientes y el 51,6% de los alelos, *ii*) la mutación p.W798R es la segunda más frecuente apareciendo en el 16,8% de los pacientes y en el 11,6% de los alelos, *iii*) la mutación p.G205S se observó en el 14,7% de los pacientes y en el 11,6% de los alelos. Estos resultados de epidemiología molecular de la enfermedad son similares a los obtenidos en la serie de 40 pacientes estudiados anteriormente en nuestro grupo (Martin, et al., 2001a). Sin embargo, este estudio demuestra que la mutación privada de la población española p.W798R es la segunda más frecuente en los pacientes. Estos resultados confirman la heterogeneidad molecular observada en otros estudios (Andreu, et al., 2007; Aquaron, et al., 2007; Delmont, et al., 2008; Deschauer, et al., 2007; Fernandez-Cadenas, et al., 2007; Rubio, et al., 2007a; Sohn, et al., 2008; Tsujino, et al., 1993; Vieitez, et al., 2008) y el hecho de que las mutaciones descritas se distribuyen de manera equivalente en las zonas amino y carboxi-terminal de la proteína. Estos hallazgos deben ser tenidos en cuenta cuando se plantean estrategias de diagnóstico molecular en poblaciones específicas.

Hemos comprobado que las nuevas mutaciones descritas (5 de ellas resultan en cambio de aminoácido y otras 5 producen codones de terminación prematura) cumplen los criterios de patogenicidad establecidos. En cuanto a las mutaciones con cambio de aminoácido (Rubio, et al., 2007a), la mutación p.A365V parece desestabilizar un sitio muy conservado que se encuentra cerca de varios residuos implicados en la unión de glucógeno (Hudson, et al., 1993). La mutación p.G174D modifica un sitio muy conservado cercano a dos grupos de aminoácidos importantes en la dimerización de la proteína (Hudson, et al., 1993). La mutación p.R490W altera un sitio muy conservado cercano al sitio de unión de piridoxal fosfato (PLP) (Hudson, et al., 1993). La mutación p.I83F afecta a un sitio muy conservado que se localiza en una zona de la proteína que es esencial para la dimerización de la misma, y para la unión de AMP y PLP (Hudson, et al., 1993). La mutación p.Q577R modifica una posición muy conservada, situada en una zona donde residen aminoácidos relacionados con el sitio activo de la GPM, con la unión a glucosa y a PLP (Hudson, et

al., 1993). Parece por tanto, que estas mutaciones con cambio de aminoácido, pueden probablemente afectar a sitios de unión de la proteína implicados en la actividad enzimática de la GPM. Además, se piensa que son responsables de producir un déficit de miofosforilasa debido a: *i)* es el único cambio nucleotídico detectado tanto en la zona codificante como en las zonas adyacentes de unión exón/intrón del gen *PYGM*, *ii)* los aminoácidos a los que afectan los cambios de nucleótidos están altamente conservados no solo en la glucógeno fosforilasa de otras especies, sino también en las tres isoformas humanas del enzima (Hudson, et al., 1993), lo que justifica la importancia de esos residuos afectados en la función de la GPM, *iii)* no se ha encontrado ninguna de las nuevas mutaciones descritas en 100 controles sanos y 50 controles con diversas patologías (300 alelos).

En cuanto a las nuevas mutaciones terminadoras descritas (Rubio, et al., 2007a): *i)* el reemplazo p.C784X predice la terminación prematura de la traducción generando una proteína truncada de 783 residuos en lugar de los 842 correspondientes la a GPM normal, *ii)* la mutación p.L5VfsX22 produce la aparición de un PTC 22 residuos cadena abajo de la mutación, *iii)* el cambio p.Q73HfsX7 predice la aparición de un PTC 7 aminoácidos cadena abajo de la mutación, *iv)* la sustitución p.N134KfsX161 es responsable de la aparición de un PTC 161 residuos cadena abajo de la mutación, *v)* el cambio p.R491AfsX7 produce un PTC 7 residuos después de la mutación. En estas mutaciones se prevé la síntesis de una proteína de menor tamaño siendo lo más probable que se produzca la degradación de los péptidos sintetizados, aunque también es posible que ocurra una degradación del RNA mensajero (Maquat, 2002). En cualquier caso, no se produciría la síntesis de miofosforilasa. Por otra parte no se han encontrado ninguna de estas mutaciones en 300 alelos control.

De los 55 pacientes estudiados, solo en 5 de ellos se pudo caracterizar un alelo mutado, una vez secuenciada toda la región codificante y las zonas de unión intrón-exón del gen *PYGM*. Ninguno de estos pacientes presentó actividad enzimática de miofosforilasa, pese a esperar que el enzima tuviese alguna actividad residual. Este tipo de pacientes ha sido denominado comúnmente como “heterocigotos manifiestos” (pacientes con una única mutación identificada pero con manifestaciones clínicas de la enfermedad) (Manfredi, et al., 1993). Es posible que el otro alelo sin caracterizar presente alguna mutación en una región intrónica o en alguna región reguladora del gen *PYGM* no secuenciadas por el método aquí utilizado (Kubisch, et al., 1998). Para poder comprobar este hecho, podrían utilizarse análisis a nivel de mRNA, donde se pueda comprobar el correcto procesamiento de los transcritos del gen. En este

sentido, se han descrito dos variantes sinónimas en zonas exónicas cercanas al intrón correspondiente que han mostrado alteraciones en el procesamiento del mensajero (Fernandez-Cadenas, et al., 2003) (Garcia-Consuegra, et al., 2008, J Med Genet, 2008, aceptado para publicación).

4.2 ESTRATEGIA DIAGNÓSTICA

Se ha propuesto una estrategia de diagnóstico molecular en sangre basada en los resultados de epidemiología molecular de la serie con mayor número de pacientes con enfermedad de McArdle estudiada en Europa (Rubio, et al., 2007a). El protocolo propuesto comienza con criterios de inclusión clínicos: intolerancia al ejercicio, elevación persistente de CK, curva plana de ácido láctico en la prueba de ejercicio en isquemia, fenómeno del segundo aliento y mioglobulinuria. A partir de DNA obtenido de muestra sanguínea, la estrategia propuesta consta de las siguientes etapas: i) cribado secuencial mediante métodos sencillos de PCR-RFLP en función de la frecuencia de las tres mutaciones más comunes en la población española, p.R50X, p.W798R y p.G205S, lo que permitiría caracterizar definitivamente cerca del 60% de los pacientes, ii) secuenciación completa de los exones, 1, 14, 17 y 18, que presentan una mayor incidencia de mutaciones, lo que aumentaría la eficiencia de la estrategia llegando a una identificación de los dos alelos mutados en el 75% de los pacientes. Siguiendo este protocolo, en tres de cada cuatro pacientes (75%), no sería necesario practicar una intervención invasiva como es la biopsia muscular para diagnosticar la enfermedad. En el resto de pacientes no identificados a nivel molecular sería necesario practicar una biopsia muscular para establecer el diagnóstico histoquímico y/o bioquímico de la enfermedad, previo al diagnóstico molecular definitivo mediante secuenciación completa del gen *PYGM*. La utilización de la secuenciación de los exones “calientes” con mayor incidencia de mutaciones (del inglés “hot spot”) en la estrategia propuesta debería analizarse desde un punto de vista coste-efectivo valorando variables como la disponibilidad de tecnología molecular necesaria y el coste de la realización de la biopsia muscular frente a la extracción de sangre, considerando entonces si el incremento en el 15% de eficiencia estaría justificado. En todo caso, el cribado de las mutaciones más frecuentes mediante PCR-RFLP sería trasladable a cualquier laboratorio clínico facilitando el diagnóstico no invasivo en el 60% de los pacientes. Por otro lado, la identificación molecular correcta de los alelos mutados es de gran importancia, pues varias vías terapéuticas experimentales actuales dependen del tipo de mutaciones encontradas (Welch, et al., 2007).

4.3 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Como se ha indicado anteriormente se han descrito más de 100 mutaciones en el gen *PYGM*, siendo la mutación terminadora p.R50X la más frecuente en población caucásica. Existen otras mutaciones como la p.G205S que aparecen con menor frecuencia, y otro amplio grupo de mutaciones denominadas “privadas” correspondientes a poblaciones específicas, como son las descritas en pacientes asiáticos (Sohn, et al., 2008; Tsujino, et al., 1994b), italianos (Bruno, et al., 2006), franceses (Aquaron, et al., 2007; Delmont, et al., 2008) o españoles (Fernandez, et al., 2000; Rubio, et al., 2000a; Vieitez, et al., 2008).

A esta amplia heterogeneidad molecular hay que sumar la también característica heterogeneidad clínica de la enfermedad de McArdle. Se han estudiado diversos aspectos que pudieran justificar la misma. Entre ellos se ha valorado la posible influencia del genotipo en la gravedad de la expresión clínica de la enfermedad, fundamentalmente considerando la mutación p.R50X.

En nuestra serie, la comparación entre los diferentes genotipos y el grado de afectación clínica descrito por el grupo de Martinuzzi (*Martinuzzi, et al., 2003*), no ha permitido establecer ningún tipo de correlación. Este resultado ya había sido observado previamente en grupos con un número mucho menor de pacientes (Deschauer, et al., 2007; Martinuzzi, et al., 2003) y en un reciente trabajo del grupo de Delmont con pacientes franceses (Delmont, et al., 2008). De hecho se han descrito familias con genotipos idénticos que cursan con manifestaciones clínicas diferentes (Iyengar, et al., 1997; Papadimitriou, et al., 1990).

Se ha de considerar que en nuestra serie de pacientes la posible correlación genotipo-fenotipo se ha realizado en base a la escala creciente de gravedad descrita por el grupo del Dr. Martinuzzi (*Martinuzzi, et al., 2003*), que no utiliza variables cuantitativas para establecer los niveles de afectación clínica, y que se fundamenta en una escala cualitativa que diferencia los grados de afectación en base a manifestaciones clínicas que en algún caso pueden llevar a confusión. Por ejemplo, un paciente casi asintomático con un episodio ocasional de mioglobulinuria se incluiría en la categoría 2 de la escala de gravedad clínica (siendo ésta; 0, 1, 2 y 3), que implica un alto grado de afectación clínica cuando realmente esto no ocurre. Además, la sintomatología va muy ligada al tipo, intensidad y duración del ejercicio que la provoque, es decir vendrá en

gran medida determinada por el estilo de vida de los pacientes, así como por los requerimientos físicos de su actividad laboral, la práctica habitual de ejercicio físico, la dieta, específicamente la ingesta o no de glucosa antes de la realización de ejercicio y el manejo de la aparición del fenómeno de “segundo aliento”. De lo indicado anteriormente se puede deducir que el desarrollo de una escala de gravedad clínica basada principalmente en criterios cuantitativos permitiría posiblemente mejorar la precisión y la objetividad en los estudios de correlación genotipo-fenotipo en la enfermedad de McArdle. Para establecer variables cuantitativas que sirvan para caracterizar funcionalmente a los pacientes podrían utilizarse pruebas fisiológicas validadas del ejercicio físico (Mate-Munoz, et al., 2007). Una escala funcional de este tipo permitiría por otra parte poner a punto programas de entrenamiento ajustados a la necesidad funcional de cada individuo (Perez, et al., 2007a; Perez, et al., 2007b).

Otro aspecto que se ha de considerar es el efecto que producen las mutaciones a nivel post-genómico. En este sentido, en ésta y en otras enfermedades, cada vez hay mayor evidencia de que el efecto previsto a nivel de DNA genómico es diferente del efecto observado a nivel de RNA mensajero. Así se ha observado que las mutaciones terminadoras pueden no producir las teóricamente esperadas proteínas truncadas debido a que los transcritos pueden ser degradados por el mecanismo del NMD (Sohn, et al., 2008). Por otro lado las variantes sinónimas o “neutras”, pueden afectar también al procesamiento de los mensajeros (Fernandez-Cadenas, et al., 2003) (Garcia-Consuegra, et al., 2008, J Med Genet, 2008, aceptado para publicación). Por tanto los estudios de secuenciación y de cuantificación de los mensajeros pueden proporcionar una información mucho más fidedigna del efecto que producen las mutaciones o los polimorfismos en el DNA genómico. Y habrán de ser considerados a la hora de estudiar la posible asociación del genotipo y del fenotipo en las enfermedades genéticas en general y en la enfermedad de McArdle en particular.

Otro aspecto que podría influir en la correlación entre el genotipo y la gravedad clínica sería el hecho de que la glucógeno fosforilasa muscular tuviera otras funciones ahora desconocidas, cuya alteración influyera de forma más marcada en la fisiopatología de la enfermedad. En este sentido, se ha descrito que la miofosforilasa puede actuar como sustrato natural de una isoforma de la calpaina (Purintrapiban, et al., 2001). En este trabajo los autores indican que la glucógeno fosforilasa interacciona con la calpaina 3 (isoforma muscular) que a su vez es posible que regule tanto la degradación como la actividad de la miofosforilasa. Por tanto es necesario considerar la posible influencia de otros genes y proteínas en el fenotipo de la enfermedad de

McArdle. Sería por tanto muy interesante poder disponer de un modelo celular en el que se pudieran realizar estudios a gran escala de genes que expresen proteínas musculares con diferentes funciones (estructural, metabólica, etc), para intentar averiguar si existe alguna asociación directa o indirecta con la miofosforilasa. También sería de gran utilidad disponer de un modelo animal manejable en el laboratorio que reprodujese los síntomas característicos de esta enfermedad con el que poder realizar este tipo de estudios en organismo entero, a diferencia de los modelos animales naturales de enfermedad existentes hasta el momento (modelo bovino y modelo ovino).

4.4 GENES Y OTROS ASPECTOS MODIFICADORES DEL FENOTIPO

Además de la posible asociación entre el genotipo y el fenotipo clínico, durante los últimos años se han estudiado otros aspectos que pudieran clarificar la heterogeneidad clínica de la enfermedad. Parece razonable pensar que algunos genes implicados tanto en la función muscular como en la capacidad física pudieran ejercer algún efecto modulador del fenotipo clínico de los pacientes. Estudios previos han intentado encontrar la posible influencia que pudieran ejercer los genes *AMPD1* y *ACE* en la afectación clínica (Martinuzzi, et al., 2003).

- El gen *AMPD1* codifica la isoforma muscular de la AMP desaminasa (MADA) (Fishbein, 1984) que desempeña un papel importante en el ciclo de los nucleótidos de purina y se encuentra fundamentalmente en fibras tipo II (Fishbein, et al., 1978). Su déficit es una causa común de miopatía inducida por el ejercicio y probablemente la más habitual de miopatía metabólica en humanos. Se ha estimado una frecuencia de este déficit en alrededor del 2% de las biopsias musculares enviadas para estudios histopatológicos. Aún más, se ha observado dicho déficit en el 2% de individuos sanos (Norman, et al., 1995), apareciendo en el 2% de la población la mutación c.34C>T en estado de homocigosis y en el 20% en estado de heterocigosis (Rico-Sanz, et al., 2003). La presencia de la mutación c.34C>T en estado de heterocigosis produce una disminución de la actividad de MADA, siendo esta en torno al 38-39% de la de los controles con el genotipo normal CC (Norman, et al., 1995), reduciéndose la capacidad para consumir ATP con el consiguiente acúmulo de IMP durante el ejercicio intenso. El hecho de que esta mutación se observe tan frecuentemente en población normal conlleva a que

no se pueda descartar cierto grado de afectación en la capacidad funcional, al menos en aquellos individuos con otra alteración concurrente que produzca intolerancia al ejercicio.

- En el gen de la enzima convertidora de angiotensina, *ACE*, la presencia del alelo *D* (deleción) se ha relacionado con un aumento de actividad sérica de ECA, aumentando la conversión de angiotensina I a angiotensina II, lo que produce una mayor vasoconstricción. Mientras que la presencia del alelo *I* (inserción), se ha asociado con una disminución de la actividad sérica de ECA, es decir una menor vasoconstricción y por tanto un mayor aporte oxígeno al tejido muscular (Tiret, et al., 1992).

El polimorfismo *I/D* del gen *ACE* ha sido estudiado en atletas de élite (Rankinen, et al., 2006), para determinar si existe un condicionamiento genético que ofrezca una ventaja o mayor rendimiento en la práctica de un determinado tipo de actividad física o prueba atlética. Varios estudios indican una asociación de un determinado alelo en función del tipo de ejercicio de los atletas, detectándose una mayor presencia del alelo *I* en atletas de resistencia, mientras que en velocistas el alelo *D* es más habitual (Lucia, et al., 2005b; Myerson, et al., 1999).

En el año 2003 se describió por primera vez una posible asociación entre la gravedad clínica de los pacientes con GSD V y el polimorfismo *I/D* del gen *ACE* (Martinuzzi, et al., 2003). Analizando 47 pacientes se observó una asociación significativa ($p < 0.01$) entre el número de alelos *D* y la gravedad del fenotipo clínico (Martinuzzi, et al., 2003).

En esta tesis además de evaluar los polimorfismos en los genes *ACE* y *AMPD1* se ha tratado de abordar el posible efecto de otros dos genes con demostrada influencia en la capacidad física, *ACTN3* y *PPARGC1A*, en el fenotipo de los pacientes de nuestra serie.

- El gen *ACTN3* codifica para α -actinina-3, proteína componente principal de la línea Z sarcomérica, que juega un papel decisivo en el proceso de contracción de la célula muscular. Sirve como punto de anclaje y ayuda a unir los filamentos de actina a la línea Z, mantiene el ordenamiento de los miofilamentos y la contracción coordinada de los mismos (Blanchard, et al., 1989). La línea Z proporciona ayuda estructural para la transmisión de la fuerza cuando se activan las fibras musculares

durante las contracciones potentes que son típicas de las fibras musculares tipo II o de contracción rápida. Estas fibras obtienen energía a partir de la glucosa, son esenciales para generar potencia y velocidad, almacenan glucógeno y poseen enzimas que permiten a sus células quemar combustible en ausencia de oxígeno (metabolismo anaeróbico).

La presencia del polimorfismo c.1747C>T (p.R577X) (North, et al., 1999) se ha asociado, en deportistas de élite, a una determinada aptitud atlética (Rankinen, et al., 2006). La variante genética que codifica para la α -actinina-3 funcional (p.R577R) parece ser beneficiosa para los atletas que utilizan principalmente las fibras musculares tipo II durante su ejercicio, es decir aquellos atletas que practican disciplinas donde se requiere velocidad (Yang, et al., 2003).

En el caso de los pacientes con enfermedad de McArdle, la presencia del polimorfismo p.R577X en estado de homocigosis o en heterocigosis (en lugar del genotipo normal p.R577R), implicaría la ausencia total o parcial de α -actinina-3 en las fibras tipo II (Lucia, et al., 2007a). El bloqueo de la glucogenosis que sufren estos pacientes va a afectar a la capacidad oxidativa de las fibras musculares. Las fibras tipo II (donde se expresa la α -actinina-3) utilizan principalmente el glucógeno como sustrato metabólico de obtención energética, y además requieren mayor aporte para una carga determinada que las fibras tipo I. Todo esto presupone que la ausencia parcial o total de la α -actinina-3 podría beneficiar a los pacientes con GSD V. En este sentido se ha comprobado que en las mujeres con GSD V, que portan el polimorfismo p.R577X del gen *ACNT3*, existe una mejora en la capacidad para realizar ejercicio físico, considerando los parámetros clásicos que valoran este aspecto como $VO_{2\text{pico}}$ y VT en comparación con aquellas pacientes que presentan el genotipo normal p.R577R (Lucia, et al., 2007a).

- El gen *PPARGC1A*, es un coactivador de los genes del sistema de fosforilación oxidativa que controla la oxidación de lípidos y glucosa al inducir la biogénesis mitocondrial en condiciones de estrés energético mediante la coactivación de factores de transcripción nucleares y mitocondriales (Finck and Kelly, 2006; Lucia, et al., 2005a; Puigserver and Spiegelman, 2003; Terada and Tabata, 2004; Tunstall, et al., 2002). El gen *PPARGC1A* participa en la transformación de músculos glucolíticos en músculos con fenotipo oxidativo (Lin, et al., 2002), expresándose preferentemente en grupos musculares con alto contenido en fibras tipo I. A su vez es un coactivador del receptor PPAR δ en células musculares, el

cual está implicado en la regulación del metabolismo lipídico en tejido muscular esquelético, la oxidación de ácidos grasos, la utilización de triglicéridos en células musculares (Wang, et al., 2003) y en la formación del tipo de fibras musculares (Wang, et al., 2004).

La expresión de este gen se ha relacionado con una mejora significativa en la capacidad física tanto con una carga de trabajo a intensidades de ejercicio submáximo, como con un aumento gradual de la carga hasta el agotamiento (Calvo, et al., 2008). Aunque, otros autores indican que la sobre-expresión en tejido muscular puede producir una disminución de la condición física durante los ejercicios de alta intensidad, probablemente debido a la incapacidad de utilizar el glucógeno muscular almacenado (Wende, et al., 2007). En concreto la presencia del polimorfismo G482S en el gen *PPARGC1A*, se ha asociado con una mejor capacidad aeróbica en humanos (Franks, et al., 2003; Ling, et al., 2004; Lucia, et al., 2005a). En deportistas que realizan ejercicio de resistencia se observa una menor presencia del alelo p.S482S en comparación con una población control (Lucia, et al., 2005a).

En esta tesis se ha evaluado el efecto modulador de los genes *ACE*, *AMPD1*, *ACTN3* y *PPARGC1A* en una serie amplia de pacientes (99 pacientes españoles) afectos de GSD V, con una distribución por sexo de 60 hombres y 39 mujeres, y con edades comprendidas entre 8 y 81 años, con el objeto de esclarecer la heterogeneidad clínica característica de la enfermedad (Rubio, et al., 2007b). Para ello se clasificó retrospectivamente a todos los pacientes bajo los criterios clínicos establecidos por el grupo de Martinuzzi (Martinuzzi, et al., 2003). Se utilizó un test estadístico no-paramétrico independiente para valorar la relación entre las siguientes variables cualitativas: gravedad clínica, genotipo *ACE* (I/D), *AMPD1* (Q12X), *PYGM* (R50X), *PPARGC1A* (p.G248S) y *ACTN3* (p.R577X). También se analizó el efecto de la edad en la gravedad clínica, utilizándose un test de Kruskal-Wallis para comparar la media de edad de los pacientes asignados a cada categoría de la escala clínica. También se estudió la posible influencia del sexo en el fenotipo clínico utilizando un test U de Mann-Whitney.

En esta serie de 99 pacientes, no encontramos asociación entre la edad y la gravedad clínica ($p=0.420$ con un test Kruskal-Wallis), ni tampoco entre la mutación más prevalente p.R50X y dicha gravedad (Rubio, et al., 2007b).

Un hallazgo notable fue el mayor grado de afectación clínica ($p=0.019$) observado en las mujeres con la enfermedad (valores medios obtenidos, $1,82 \pm 1,02$ en mujeres y $1,35 \pm 0,90$ en hombres) (Rubio, et al., 2007b). El 41% de las mujeres estudiadas se encuadró en el grupo de mayor gravedad fenotípica frente al 20% de los hombres (Rubio, et al., 2007b). Una posible explicación sería que la presencia de más masa muscular en los hombres (debido a la influencia de testosterona) pudiera ejercer un efecto protector en la enfermedad teniendo en cuenta que el propio curso clínico de la misma implica cierto grado de pérdida de masa muscular (Mate-Munoz, et al., 2007). Esta influencia del sexo había sido sugerida previamente por el grupo de Rommel (Rommel, et al., 2006), con la hipótesis de la posible contribución de factores genéticos relacionados con el sexo en el desarrollo de un síntoma crónico de la enfermedad como es el dolor.

En esta tesis también se ha comprobado la posible implicación del sexo en la enfermedad desde un punto de vista funcional. En un grupo de 44 pacientes (23 hombres y 21 mujeres) (Rubio, et al., 2008) se observó una asociación significativa ($p < 0,05$) entre la presencia en heterocigosis del alelo mutado c.34C>T del gen *AMPD1* y una menor capacidad aeróbica submáxima, por tanto un menor umbral ventilatorio (VT) en mujeres con enfermedad de McArdle. Sin embargo, en los 23 pacientes varones estudiados (5 heterocigotos y 18 normales para el genotipo c.34C>T del gen *AMPD1*) (Rubio, et al., 2008), no se encontró asociación alguna entre la mutación y los índices de capacidad física. Este hecho sugiere que el déficit parcial de MADA influye únicamente en aquellos pacientes que presentan una capacidad física más deteriorada, como ocurre en las mujeres afectas con enfermedad de McArdle que concomitantemente son heterocigotas para la mutación c.34C>T en el gen *AMPD1*. Así, el valor de VO_2 en el umbral ventilatorio en las 16 mujeres con enfermedad de McArdle normales para el genotipo c.34C>T fue de $11,0 \pm 0,9$ ml/kg/min, mientras que en las 4 mujeres heterocigotas para dicha mutación fue de $7,9 \pm 0,4$, lo que se considera en el límite para desarrollar una actividad diaria normal (4-5 Km/h) (Rubio, et al., 2008). Esta influencia del sexo en la capacidad funcional ha sido también observada recientemente en un estudio con 46 pacientes con McArdle (Mate-Munoz, et al., 2007), en un grupo de 40 pacientes (21 hombres y 19 mujeres) (Lucia, et al., 2007a) y en otra serie de 44 pacientes (23 hombres y 21 mujeres) (Gomez-Gallego, et al., 2008). Los hallazgos encontrados en esta tesis junto al resto de resultados descritos anteriormente sugieren que el sexo podría ser un factor implicado en la variabilidad clínica de los pacientes con enfermedad de McArdle.

Otro hallazgo importante fue la asociación ($P < 0,0001$) entre el número de alelos *D* del gen *ACE* y la gravedad de los pacientes (Rubio, et al., 2007b). En los 99 pacientes estudiados, al comparar la incidencia del alelo *I* con la escala de Martinuzzi (Martinuzzi, et al., 2003), se observó que cuando disminuye la incidencia del alelo *I* del gen *ACE* aumenta la gravedad clínica de los pacientes (50,05% en los pacientes grado 0; 42,10% en los grado 1; 33,33% en los grado 2; y 11,55% en los grado 3) (Rubio, et al., 2007b). La frecuencia del alelo *D* del gen *ACE* fue del 88,45% en los pacientes con máxima puntuación en la escala de gravedad clínica. Estos datos sugieren que dicho alelo modificaría negativamente el cuadro clínico en la enfermedad de McArdle, de acuerdo, por otra parte, con los resultados descritos previamente (Martinuzzi, et al., 2003). Entre ambos estudios se analizaron un total de 146 pacientes, que conforman un número considerable teniendo en cuenta que la prevalencia estimada de la enfermedad es 1:100000 (Haller, 2000).

La asociación de una mayor proporción de alelos *D*, con el mayor deterioro clínico podría explicarse teniendo en cuenta, por contraposición, el efecto beneficioso observado cuando aumenta relativamente el alelo *I*. Dicho incremento relativo, produciría una disminución en la actividad de la ECA, mejorando la función cardiovascular durante el ejercicio (Gomez-Gallego, et al., 2008), aumentando la captación de glucosa y la adaptación de las enzimas glucolíticas en el músculo esquelético (Henriksen, et al., 1999). Por tanto, una mayor capacidad de utilizar la glucosa sanguínea como fuente de energía durante la contracción muscular, junto con una menor dependencia del metabolismo de las grasas podría ser beneficioso para estos pacientes especialmente en aquellos con mayor afectación clínica, ya que la glucosa es una fuente de energía más eficiente considerando la cantidad de ATP generado por mol de oxígeno.

Basándose en estos datos genético-moleculares y dado que el tratamiento con inhibidores de la ECA mejora la capacidad aeróbica de pacientes con insuficiencia cardíaca (Hamroff, et al., 1999), y que Ramipril (conocido inhibidor de la ECA) favorece la práctica del ejercicio físico y la fuerza muscular en pacientes con cardiomiopatía y en mujeres hipertensas (Onder, et al., 2002), Martinuzzi et al (Martinuzzi, et al., 2008), realizaron un ensayo clínico doble-ciego aleatorio para la evaluación del uso de este fármaco en pacientes con enfermedad de McArdle. No observaron cambios significativos en la capacidad física de los pacientes, si bien el número de individuos tratados en el estudio fue escaso.

En un estudio reciente se evaluó funcionalmente el posible efecto modulador del gen *ACE* en 44 pacientes con enfermedad de McArdle (23 hombres y 21 mujeres) (Gomez-Gallego, et al., 2008). Los autores observaron que el alelo *I* del gen *ACE*, se asocia con una mayor capacidad funcional en mujeres con enfermedad de McArdle, lo que puede ayudar a explicar la variabilidad clínica en los pacientes con esta enfermedad. Parece por tanto que el alelo *I* del gen *ACE* juega un papel protector en la tolerancia al ejercicio en mujeres con la enfermedad de McArdle.

En cuanto al resto de los genes estudiados, no se encontró ninguna asociación entre los genotipos estudiados y la gravedad clínica de los pacientes evaluados (Rubio, et al., 2007b).

En el caso del gen *AMPD1*, en una serie de 47 pacientes italianos estudiados no se encontró ninguna asociación entre el polimorfismo c.34C>T del gen y el grado de afectación clínica (Martinuzzi, et al., 2003). Estos hallazgos están de acuerdo con los obtenidos en una serie más reducida de 6 pacientes españoles sin parentesco con enfermedad de McArdle, donde el efecto de la combinación de déficits de MADA y GSD V parece no agravar el cuadro clínico de la glucogenosis (Rubio, et al., 2000c). Otros estudios han mostrado resultados contradictorios, pues algunos autores no encuentran ningún efecto del gen *AMPD1* en el fenotipo de la enfermedad de McArdle (Martinuzzi, et al., 2003; Rubio, et al., 2000c), mientras que otros sugieren el agravamiento del cuadro clínico en pacientes que presentan un fallo genético combinado (Rubio, et al., 1997; Tsujino, et al., 1995a). En esta tesis, en la serie de 99 pacientes, tampoco hemos encontrado asociación genotipo-fenotipo para el polimorfismo indicado con anterioridad, lo que puede ser atribuido a la baja frecuencia de homocigotos de la serie, ya que únicamente se identificaron 3 pacientes, y solo uno de ellos se encuadró en el grupo de mayor afectación clínica, lo que contrasta con que el genotipo XX se haya relacionado con una menor capacidad aeróbica y una menor respuesta al entrenamiento (Rico-Sanz, et al., 2003).

Tampoco se obtuvo ninguna asociación entre el gen *PPARGC1A* y el fenotipo clínico en los pacientes estudiados (Rubio, et al., 2007b), a pesar de la conocida importancia de este gen tanto en la función muscular (Finck and Kelly, 2006; Puigserver and Spiegelman, 2003) como en la capacidad física (Franks, et al., 2003; Lucia, et al., 2005a). Esto indica que posiblemente el gen *PPARGC1A* podría estar implicado en la capacidad oxidativa muscular y no en otras vías metabólicas.

En cuanto al gen *ACTN3*, la ausencia total o parcial de α -actinina-3 (presencia del polimorfismo p.R577X en homocigosis o en heterocigosis) en las fibras tipo II de los pacientes con enfermedad de McArdle podría teóricamente beneficiar a los mismos. Sin embargo, el estudio del polimorfismo p.R577X del gen *ACTN3* no ha mostrado ninguna asociación con el grado de afectación clínica de los enfermos de nuestra serie (Rubio, et al., 2007b). Si bien parece no existir correlación desde un punto de vista clínico, recientemente se ha descrito una posible asociación de este polimorfismo y una mejor capacidad funcional en un grupo de mujeres con enfermedad de McArdle (Lucia, et al., 2007a). Este dato sugiere que probablemente sería más adecuado realizar los estudios de asociación genotipo-fenotipo utilizando variables cuantitativas que permitieran caracterizar funcionalmente a los pacientes.

4.5 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN EN EL GEN *PYGM*

Las mutaciones terminadoras, las mutaciones que alteran el marco de lectura y aquellas que afectan al correcto “corte y empalme de exones”, inducen la aparición de PTCs que pueden desestabilizar los RNA mensajeros (Kinniburgh, et al., 1982; Leeds, et al., 1991). Todas estos tipos de mutaciones predicen proteínas truncadas, que posiblemente no se sinteticen o bien lo hagan en poca cantidad, debido a un mecanismo de supervivencia del RNA denominado “Degradación mediada por proteínas terminadoras” (del inglés “Nonsense mediated decay”) que conlleva la eliminación de la mayoría de los transcritos que contienen PTCs (Maquat, 2002). Este mecanismo protegería al organismo frente al efecto deletéreo de proteínas truncadas que tuvieran un efecto negativo dominante o de ganancia de función, además de ser un proceso crítico en el desarrollo celular (Frischmeyer and Dietz, 1999). El mecanismo presenta una regla que se cumple en la mayor parte de los casos y que implica el no reconocimiento de aquellos PTCs situados en la región que comprende los últimos 50-55 nucleótidos del penúltimo exón y el último exón del gen (Cheng, et al., 1994; Maquat, 2002; Zhang and Maquat, 1997). Aproximadamente una tercera parte de las enfermedades genéticas son debidas a la presencia de PTCs en mensajeros que son degradados total o parcialmente mediante el NMD (Correa-Cerro, et al., 2005; Frischmeyer and Dietz, 1999).

Se han observado disminuciones en la cantidad de mensajeros mutados con PTCs, en diferentes enfermedades, como cáncer de mama (Perrin-Vidoz, et al., 2002), enfermedad de Gaucher (Montfort, et al., 2006), o en trastornos debidos a mutaciones

en el gen de la DNA polimerasa gamma (Chan, et al., 2005). La degradación de estos mensajeros que portan PTCs puede relacionarse con el fenotipo clínico de los pacientes (Frischmeyer and Dietz, 1999). En este sentido los pacientes con enfermedad de McArdle son un buen modelo de estudio del NMD debido a que la mutación p.R50X tiene una incidencia del 50% en población caucásica, y que aproximadamente el 35% del resto de mutaciones descritas en éstos producen PTCs (Aquaron, et al., 2007; Deschauer, et al., 2007; Nogales-Gadea, et al., 2007; Rubio, et al., 2007a; Rubio, et al., 2007b).

Se ha estudiado la contribución de cada uno de los alelos mutantes en el mecanismo del NMD en una serie de 28 pacientes con enfermedad de McArdle, determinando sí, ambos, uno o ninguno de los transcritos mutantes estaba presente en el mRNA de cada uno de los pacientes (Nogales-Gadea, et al., 2008). Las 17 mutaciones diferentes presentes en la serie, incluían; mutaciones puntuales de terminación y de cambio de aminoácido (p.R50X, p.R94W, p.E125X, p.R194W, p.G205S, p.R602W, p.A660D, p.A704V, and p.W798R); delecciones (p.L5VfsX22, p.N134KfsX161, p.D534VfsX5, and p.K754NfsX49); duplicaciones (p.Q73HfsX7 and p.R491AfsX7); y inserciones/delecciones (p.W388SfsX34 and p.E797VfsX19).

En el grupo estudiado, el 77% de las mutaciones presentes generaban PTCs, y el mecanismo de degradación de los mensajeros indicado actuaba en el 92% de los pacientes, lo que demuestra la importancia del mismo en esta enfermedad (Nogales-Gadea, et al., 2008). El NMD, produjo la eliminación mayoritaria de los mensajeros que portaban codones de terminación prematura, expresándose únicamente aquellos alelos que portaban mutaciones con cambios aminoacídicos. En todos los genotipos estudiados con la mutación p.R50X se observó siempre la participación de NMD, así como en otras 7 mutaciones que producían PTCs (p.L5VfsX22, p.Q73HfsX7, p.E125X, p.N134KfsX161, p.W388_V390delinsSfsX33, p.R491AfsX7 y p.D534VfsX4). Sin embargo, la mutación p.E797VfsX19 que predice también un PTC, eludió el mecanismo NMD, ya que al situarse en el último exón del gen *PYGM* escaparía a la regla de los 50-55 nucleótidos indicada anteriormente (Cheng, et al., 1994; Maquat, 2002; Nagy and Maquat, 1998; Zhang and Maquat, 1997). Sin embargo, en los 3 pacientes de la serie que presentaron la mutación p.K754NfsX49 que también predice un PTC, no se observó el NMD, incumpliendo por tanto las reglas que regulan dicho mecanismo (Nogales-Gadea, et al., 2008). Este hecho ya fue descrito en otra alteración molecular similar en el gen de la apolipoproteína B (Chester, et al., 2003). También se ha observado que algunas mutaciones de cambio de aminoácido, ven

alterada la estabilidad de los mensajeros y sufren el NMD (Nogales-Gadea, et al., 2008). Este es el caso de la mutación p.A704V, descrita en esta tesis, en la que no se detectaron los transcritos correspondientes, lo que sugiere que esta mutación podría alterar algún sitio potenciador de corte y empalme de exones (del inglés “*exonic enhancer*”), tal como se ha documentado en el caso de dos mutaciones del gen de la carbamil fosfato sintetasa (Eeds, et al., 2006).

Estudios previos indican que los perfiles transcripcionales son dependientes del genotipo. Pacientes con las mismas mutaciones presentan perfiles más homogéneos que los observados cuando las mutaciones son diferentes, indicando que la mutación es el principal factor determinante (Pros, et al., 2006). Para evaluar la importancia de cada mutación en la variabilidad genética individual y su relación con un perfil transcripcional determinado, hemos estudiado las siguientes asociaciones: *i)* p.W388SfsX34/p.K754NfsX49 en dos familiares, *ii)* p.R50X/p.D534VfsX5 en otros dos familiares, y *iii)* los siguientes genotipos repetidos de pacientes no relacionados; p.R50X/p.G205S en dos, p.R50X/p.W798R en otros dos, p.R50X/p.L5VfsX22 en otros dos y p.R50X/p.R50X en otros seis. Los pacientes que presentaron genotipos que sufrieron NMD no pudieron compararse al ser sus niveles de mRNA mensajero indetectables. Los resultados de este estudio sugieren que el fondo genético tiene una fuerte influencia en el perfil transcripcional. En el caso de dos hermanos con el genotipo p.R50X/p.D534VfsX5 los valores de expresión mRNA fueron similares (30 y el 32% respecto a controles), mientras que, en contraposición, en pacientes no relacionados con el genotipo p.R50X/p.G205S y p.R50X/p.W798R se observaron grandes diferencias en el grado de expresión de los mensajeros. Aunque el número de pacientes estudiados es pequeño, estos resultados sugieren que además del efecto mutacional, el perfil transcripcional se puede ver modificado significativamente por otros factores aún por determinar (Nogales-Gadea, et al., 2008).

De estos estudios a nivel de los transcritos del gen *PYGM*, se deduce la importancia que pueden tener las alteraciones a nivel del procesamiento del RNA en la patología molecular de esta u otras enfermedades genéticas. Como ya se había indicado anteriormente no existe correlación genotipo-fenotipo, de igual manera tampoco parece existir ninguna correlación entre el nivel de expresión de los mensajeros y el grado de gravedad clínica de los pacientes (Nogales-Gadea, et al., 2008), pese a lo indicado por Frischmeyer (Frischmeyer and Dietz, 1999). Así mismo, la aplicabilidad de estos resultados a nivel clínico implica que los análisis a nivel de los mensajeros son esenciales con el fin de llegar a caracterizar los dos alelos mutados en pacientes

denominados “heterocigotos genéticos manifiestos”, lo cual es de aplicación en otras enfermedades autosómicas recesivas.

5. CONCLUSIONES

1. Las siguientes conclusiones confirman y dan consistencia a hallazgos previamente descritos en la literatura, al deducirse del análisis de la mayor serie europea de pacientes con enfermedad de McArdle.
 - 1.1. La mutación p.R50X es la más frecuente en población española, encontrándose en el 68% de los pacientes. Otras mutaciones con relativa frecuencia son la mutación privada p.W798R que aparece en el 17 % de los pacientes y la mutación p.G205S hallada en el 15% de los mismos.
 - 1.2. No se ha observado ningún tipo de relación entre la mutación p.R50X y la gravedad clínica, por lo que deben existir otros factores que expliquen la variabilidad clínica de los pacientes con enfermedad de McArdle.
 - 1.3. La clasificación de los pacientes mediante criterios de gravedad clínica, escala de Martinuzzi, mostró una gran heterogeneidad, destacando que prácticamente el 30% de los mismos presentaron el fenotipo más grave.
 - 1.4. Se han logrado identificar 10 nuevas mutaciones en los pacientes estudiados, lo que representa aproximadamente el 10% de las mutaciones descritas, aumentando el amplio espectro mutacional de la enfermedad.
 - 1.5. Se ha encontrado una asociación entre el polimorfismo de inserción/delección (I/D) del gen *ACE* y el grado de afectación clínica de la enfermedad de McArdle, lo que podría explicar en cierta medida la variabilidad clínica de la enfermedad.
 - 1.6. No se ha encontrado ninguna asociación entre la gravedad clínica de la enfermedad de McArdle y ciertos polimorfismos de los genes *AMPD1*, *ACTN3* y *PPARGC1A* que están involucrados en la capacidad física.
2. Se propone una estrategia de diagnóstico molecular no invasivo en sangre basada en métodos sencillos de PCR-RFLP y secuenciación de los exones con alta frecuencia mutacional ("hot-spots"), que lograría identificar el genotipo en el 75% de los casos, lo que evitaría la biopsia muscular en tres de cada cuatro pacientes (75%) con sospecha de enfermedad de McArdle.

3. El sexo parece ser un factor modificador del fenotipo clínico en la enfermedad de McArdle, siendo el grado de afectación clínica significativamente mayor en las mujeres que en los hombres.
4. La mutación c.34C>T del gen *AMPD1* ejercería un efecto modulador en las mujeres con enfermedad de McArdle reduciendo su capacidad aeróbica submáxima.
5. Los alelos que presentan la mutación común p.R50X o mutaciones que generan codones de terminación prematura mostraron niveles reducidos o prácticamente indetectables de RNA mensajeros en el tejido muscular en la gran mayoría de los casos, lo que sugiere que su eliminación se debe a la acción preventiva del mecanismo de “degradación mediada por proteínas terminadoras” (NMD), mientras que las mutaciones que producen “cambio de aminoácido” parecen ser inmunes a la acción de este proceso biológico.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abe M, Higuchi I, Morisaki H, Morisaki T, Osame M. 2000. Myoadenylate deaminase deficiency with progressive muscle weakness and atrophy caused by new missense mutations in AMPD1 gene: case report in a Japanese patient. *Neuromuscul Disord* 10(7):472-7.
- Amato AA. 2003. Sweet success--a treatment for McArdle's disease. *N Engl J Med* 349(26):2481-2.
- Andersen ST, Duno M, Schwartz M, Vissing J. 2006. Do carriers of PYGM mutations have symptoms of McArdle disease? *Neurology* 67(4):716-8.
- Andersen ST, Vissing J. 2008. Carbohydrate- and protein-rich diets in McArdle disease: Effects on exercise capacity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.
- Andreu AL, Bruno C, Gamez J, Shanske S, Cervera C, Navarro C, Arbos MA, Tamburino L, Schwartz S, DiMauro S. 1998. Molecular genetic analysis of McArdle's disease in Spanish patients. *Neurology* 51(1):260-2.
- Andreu AL, Bruno C, Tamburino L, Gamez J, Shanske S, Cervera C, Navarro C, DiMauro S. 1999. A new mutation in the myophosphorylase gene (Asn684Tyr) in a Spanish patient with McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 9(3):171-3.
- Andreu AL, Nogales-Gadea G, Cassandrini D, Arenas J, Bruno C. 2007. McArdle disease: molecular genetic update. *Acta Myol* 26(1):53-7.
- Angelos S, Valberg SJ, Smith BP, McQuarrie PS, Shanske S, Tsujino S, DiMauro S, Cardinet GH, 3rd. 1995. Myophosphorylase deficiency associated with rhabdomyolysis and exercise intolerance in 6 related Charolais cattle. *Muscle Nerve* 18(7):736-40.
- Aquaron R, Berge-LeFranc JL, Pellissier JF, Montfort MF, Mayan M, Figarella-Branger D, Coquet M, Serratrice G, Pouget J. 2007. Molecular characterization of myophosphorylase deficiency (McArdle disease) in 34 patients from Southern France: identification of 10 new mutations. Absence of genotype-phenotype correlation. *Neuromuscul Disord* 17(3):235-41.
- Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, Ahmad F, Matsui T, Chin S, Wu PH and others. 2005. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab* 1(4):259-71.
- Arenas J, Martin MA. 2003. [Metabolic intolerance to exercise]. *Neurologia* 18(6):291-302.
- Argov Z, Bank WJ. 1991. Phosphorus magnetic resonance spectroscopy (31P MRS) in neuromuscular disorders. *Ann Neurol* 30(1):90-7.
- Aurino S, Nigro V. 2006. Readthrough strategies for stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol* 25(1):5-12.
- Bartram C, Edwards RH, Clague J, Beynon RJ. 1994. McArdle's disease: a rare frameshift mutation in exon 1 of the muscle glycogen phosphorylase gene. *Biochim Biophys Acta* 1226(3):341-3.
- Bausch-Jurken MT, Mahnke-Zizelman DK, Morisaki T, Sabina RL. 1992. Molecular cloning of AMP deaminase isoform L. Sequence and bacterial expression of human AMPD2 cDNA. *J Biol Chem* 267(31):22407-13.
- Blanchard A, Ohanian V, Critchley D. 1989. The structure and function of alpha-actinin. *J Muscle Res Cell Motil* 10(4):280-9.
- Bozkurt O, Verschuren WM, van Wieren-de Wijer BM, Knol MJ, de Boer A, Grobbee DE, Geerlings MI, Heerdink ER, Klungel OH. 2008. Genetic variation in the renin-angiotensin system modifies the beneficial effects of ACE inhibitors on the risk of diabetes mellitus among hypertensives. *J Hum Hypertens*.
- Braakhekke JP, de Bruin MI, Stegeman DF, Wevers RA, Binkhorst RA, Joosten EM. 1986. The second wind phenomenon in McArdle's disease. *Brain* 109 (Pt 6):1087-101.
- Bruno C, Cassandrini D, Martinuzzi A, Toscano A, Moggio M, Morandi L, Servidei S, Mongini T, Angelini C, Musumeci O and others. 2006. McArdle disease: the mutation spectrum of PYGM in a large Italian cohort. *Hum Mutat* 27(7):718.
- Bruno C, Lanzillo R, Biedi C, Iadicco L, Minetti C, Santoro L. 2002. Two new mutations in the myophosphorylase gene in Italian patients with McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 12(5):498-500.
- Bruno C, Lofberg M, Tamburino L, Jankala H, Hadjigeorgiou GM, Andreu AL, Shanske S, Somer H, DiMauro S. 1999a. Molecular characterization of McArdle's disease in two large Finnish families. *J Neurol Sci* 165(2):121-5.
- Bruno C, Minetti C, Shanske S, Morreale G, Bado M, Cordone G, DiMauro S. 1998. Combined defects of muscle phosphofructokinase and AMP deaminase in a child with myoglobinuria. *Neurology* 50(1):296-8.

- Bruno C, Tamburino L, Kawashima N, Andreu AL, Shanske S, Hadjigeorgiou GM, Kawashima A, DiMauro S. 1999b. A nonsense mutation in the myophosphorylase gene in a Japanese family with McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 9(1):34-7.
- Calvo JA, Daniels TG, Wang X, Paul A, Lin J, Spiegelman BM, Stevenson SC, Rangwala SM. 2008. Muscle-specific expression of PPARgamma coactivator-1alpha improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *J Appl Physiol* 104(5):1304-12.
- Clausen T. 2003. Na⁺-K⁺ pump regulation and skeletal muscle contractility. *Physiol Rev* 83(4):1269-324.
- Correa-Cerro LS, Wassif CA, Waye JS, Krakowiak PA, Cozma D, Dobson NR, Levin SW, Anadiotis G, Steiner RD, Krajewska-Walasek M and others. 2005. DHCR7 nonsense mutations and characterisation of mRNA nonsense mediated decay in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet* 42(4):350-7.
- Chan SS, Longley MJ, Naviaux RK, Copeland WC. 2005. Mono-allelic POLG expression resulting from nonsense-mediated decay and alternative splicing in a patient with Alpers syndrome. *DNA Repair (Amst)* 4(12):1381-9.
- Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF. 2007. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* 76:51-74.
- Chao HK, Hsiao KJ, Su TS. 2001. A silent mutation induces exon skipping in the phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria. *Hum Genet* 108(1):14-9.
- Chaussain M, Camus F, Defoligny C, Eymard B, Fardeau M. 1992. Exercise intolerance in patients with McArdle's disease or mitochondrial myopathies. *Eur J Med* 1(8):457-63.
- Cheng J, Belgrader P, Zhou X, Maquat LE. 1994. Introns are cis effectors of the nonsense-codon-mediated reduction in nuclear mRNA abundance. *Mol Cell Biol* 14(9):6317-25.
- Chester A, Somasekaram A, Tzimina M, Jarmuz A, Gisbourne J, O'Keefe R, Scott J, Navaratnam N. 2003. The apolipoprotein B mRNA editing complex performs a multifunctional cycle and suppresses nonsense-mediated decay. *Embo J* 22(15):3971-82.
- Daegelen D, Munnich A, Levin MJ, Girault A, Goasguen J, Kahn A, Dreyfus JC. 1983. Absence of functional messenger RNA for glycogen phosphorylase in the muscle of two patients with McArdle's disease. *Ann Hum Genet* 47(Pt 2):107-15.
- Delmont E, Sacconi S, Berge-LeFranc JL, Aquaron R, Butori C, Desnuelle C. 2008. [McArdle disease (glycogenosis type V): Analysis of clinical, biological and genetic features of five French patients.]. *Rev Neurol (Paris)*.
- Deschauer M, Hertel K, Zierz S. 2003. Two novel mutations in the myophosphorylase gene in a patient with McArdle disease. *Muscle Nerve* 27(1):105-7.
- Deschauer M, Morgenroth A, Joshi PR, Glaser D, Chinnery PF, Aasly J, Schreiber H, Knappe M, Zierz S, Vorgerd M. 2007. Analysis of spectrum and frequencies of mutations in McArdle disease. Identification of 13 novel mutations. *J Neurol* 254(6):797-802.
- Deschauer M, Opalka JR, Lindner A, Zierz S. 2001. A novel nonsense mutation (R269X) in the myophosphorylase gene in a patient with McArdle disease. *Mol Genet Metab* 74(4):489-91.
- Di Mauro S. 2007. Muscle glycogenoses: an overview. *Acta Myol* 26(1):35-41.
- Dietz HC, McIntosh I, Sakai LY, Corson GM, Chalberg SC, Pyeritz RE, Francomano CA. 1993. Four novel FBN1 mutations: significance for mutant transcript level and EGF-like domain calcium binding in the pathogenesis of Marfan syndrome. *Genomics* 17(2):468-75.
- Dimauro S, Andreu AL, Bruno C, Hadjigeorgiou GM. 2002. Myophosphorylase deficiency (glycogenosis type V; McArdle disease). *Curr Mol Med* 2(2):189-96.
- DiMauro S, Bresolin N. 1986. Phosphorylase deficiency. New York: McGraw-Hill.
- DiMauro S, DiMauro PM. 1973. Muscle carnitine palmityltransferase deficiency and myoglobinuria. *Science* 182(115):929-31.
- DiMauro S, Hartlage PL. 1978. Fatal infantile form of muscle phosphorylase deficiency. *Neurology* 28(11):1124-9.
- DiMauro S, Hartwig GB, Hays A, Eastwood AB, Franco R, Olarte M, Chang M, Roses AD, Fetell M, Schoenfeldt RS and others. 1979. Debrancher deficiency: neuromuscular disorder in 5 adults. *Ann Neurol* 5(5):422-36.
- DiMauro ST, S. 1995. Nonlysosomal glycogenoses. New York: McGraw-Hill.

- Du M, Liu X, Welch EM, Hirawat S, Peltz SW, Bedwell DM. 2008. PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6):2064-9.
- Edwards RH, Dawson MJ, Wilkie DR, Gordon RE, Shaw D. 1982. Clinical use of nuclear magnetic resonance in the investigation of myopathy. *Lancet* 1(8274):725-31.
- Eeds AM, Hall LD, Yadav M, Willis A, Summar S, Putnam A, Barr F, Summar ML. 2006. The frequent observation of evidence for nonsense-mediated decay in RNA from patients with carbamyl phosphate synthetase I deficiency. *Mol Genet Metab* 89(1-2):80-6.
- Ek J, Andersen G, Urhammer SA, Gaede PH, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Hansen T, Pedersen O. 2001. Mutation analysis of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) and relationships of identified amino acid polymorphisms to Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 44(12):2220-6.
- el-Schahawi M, Bruno C, Tsujino S, Sarrazin AM, Shanske S, LeRoux MG, DiMauro S. 1997. Sudden infant death syndrome (SIDS) in a family with myophosphorylase deficiency. *Neuromuscul Disord* 7(2):81-3.
- el-Schahawi M, Tsujino S, Shanske S, DiMauro S. 1996. Diagnosis of McArdle's disease by molecular genetic analysis of blood. *Neurology* 47(2):579-80.
- Engel WK. 1963. Adenosine Triphosphatase of Sarcoplasmic Reticulum Triads and Sarcolemma Identified Histochemically. *Nature* 200:588-9.
- Esterbauer H, Oberkofler H, Krempler F, Patsch W. 1999. Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics* 62(1):98-102.
- Felice KJ, Schneebaum AB, Jones HR, Jr. 1992. McArdle's disease with late-onset symptoms: case report and review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55(5):407-8.
- Fernandez-Cadenas I, Andreu AL, Gamez J, Gonzalo R, Martin MA, Rubio JC, Arenas J. 2003. Splicing mosaic of the myophosphorylase gene due to a silent mutation in McArdle disease. *Neurology* 61(10):1432-4.
- Fernandez-Cadenas I, Nogales-Gadea G, Llige D, Rubio JC, Montaner J, Arenas J, Raspall-Chaure M, Roig-Quilis M, Andreu AL. 2007. [Private mutations in the myophosphorylase gene: the first case in a patient of Latin American descent]. *Rev Neurol* 45(5):280-3.
- Fernandez R, Navarro C, Andreu AL, Bruno C, Shanske S, Gamez J, Teijeira S, Hernandez I, Teijeiro A, Fernandez JM and others. 2000. A novel missense mutation (W797R) in the myophosphorylase gene in Spanish patients with McArdle disease. *Arch Neurol* 57(2):217-9.
- Finck BN, Kelly DP. 2006. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 116(3):615-22.
- Fischer H, Esbjornsson M, Sabina RL, Stromberg A, Peyrard-Janvid M, Norman B. 2007. AMP deaminase deficiency is associated with lower sprint cycling performance in healthy subjects. *J Appl Physiol* 103(1):315-22.
- Fischer S, Drenckhahn C, Wolf C, Eschrich K, Kellermann S, Froster UG, Schober R. 2005. Clinical significance and neuropathology of primary MADD in C34-T and G468-T mutations of the AMPD1 gene. *Clin Neuropathol* 24(2):77-85.
- Fishbein W. 1986. Myoadenylate deaminase deficiency. *Myology*. New York: McGraw-Hill.
- Fishbein WN. 1984. Changes in adenylate deaminase, adenylate kinase, and creatine kinase after prolonged storage of frozen muscle biopsies. *Muscle Nerve* 7(4):340-1.
- Fishbein WN, Armbrustmacher VW, Griffin JL. 1978. Myoadenylate deaminase deficiency: a new disease of muscle. *Science* 200(4341):545-8.
- Fisher BE, Wu AD, Salem GJ, Song J, Lin CH, Yip J, Cen S, Gordon J, Jakowec M, Petzinger G. 2008. The effect of exercise training in improving motor performance and corticomotor excitability in people with early Parkinson's disease. *Arch Phys Med Rehabil* 89(7):1221-9.
- Franks PW, Barroso I, Luan J, Ekelund U, Crowley VE, Brage S, Sandhu MS, Jakes RW, Middelberg RP, Harding AH and others. 2003. PGC-1alpha genotype modifies the association of volitional energy expenditure with [OV0312]O2max. *Med Sci Sports Exerc* 35(12):1998-2004.
- Frischmeyer PA, Dietz HC. 1999. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* 8(10):1893-900.

- Gamez J, Fernandez R, Bruno C, Andreu AL, Cervera C, Navarro C, Schwartz S, Dimauro S. 1999. A new mutation in the regulatory domain of the myophosphorylase gene affecting protein dimer contact. *Muscle Nerve* 22(8):1136-8.
- Gamez J, Rubio JC, Martin MA, Fernandez-Cadenas I, Garcia-Arumi E, Andreu AL, Arenas J. 2003. Two novel mutations in the muscle glycogen phosphorylase gene in McArdle's disease. *Muscle Nerve* 28(3):380-2.
- Gautron S, Daegelen D, Mennecier F, Dubocq D, Kahn A, Dreyfus JC. 1987. Molecular mechanisms of McArdle's disease (muscle glycogen phosphorylase deficiency). RNA and DNA analysis. *J Clin Invest* 79(1):275-81.
- Gomez-Gallego F, Santiago C, Moran M, Perez M, Mate-Munoz JL, del Valle MF, Rubio JC, Garcia-Consuegra I, Foster C, Andreu IA and others. 2008. The I allele of the ACE gene is associated with improved exercise capacity in women with McArdle disease. *Br J Sports Med* 42(2):134-40.
- Gordon N. 2003. Glycogenosis type V or McArdle's disease. *Dev Med Child Neurol* 45(9):640-4.
- Gross M. 1997. Clinical heterogeneity and molecular mechanisms in inborn muscle AMP deaminase deficiency. *J Inher Metab Dis* 20(2):186-92.
- Guyton AC. 1992. Tratado de fisiología médica. Madrid [etc.]: Interamericana-McGraw-Hill.
- Guyton AC, John E. 2006. Tratado de fisiología médica. Madrid [etc.]: Elsevier.
- Hadjigeorgiou GM, Papadimitriou A, Musumeci O, Paterakis K, Flabouriaris K, Shanske S, DiMauro S. 2002a. A new stop codon mutation (Y52X) in the myophosphorylase gene in a Greek patient with McArdle's disease. *J Neurol Sci* 194(1):83-6.
- Hadjigeorgiou GM, Sadeh M, Musumeci O, Dabby R, De Girolami L, Naini A, Papadimitriou A, Shanske S, DiMauro S. 2002b. Molecular genetic study of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease) in two Yemenite-Jewish families. *Neuromuscul Disord* 12(9):824-7.
- Hall GW, Thein S. 1994. Nonsense codon mutations in the terminal exon of the beta-globin gene are not associated with a reduction in beta-mRNA accumulation: a mechanism for the phenotype of dominant beta-thalassemia. *Blood* 83(8):2031-7.
- Haller RG. 2000. Treatment of McArdle disease. *Arch Neurol* 57(7):923-4.
- Haller RG, Clausen T, Vissing J. 1998. Reduced levels of skeletal muscle Na⁺K⁺ -ATPase in McArdle disease. *Neurology* 50(1):37-40.
- Haller RG, Dempsey WB, Feit H, Cook JD, Knochel JP. 1983. Low muscle levels of pyridoxine in McArdle's syndrome. *Am J Med* 74(2):217-20.
- Haller RG, Vissing J. 2002. Spontaneous "second wind" and glucose-induced second "second wind" in McArdle disease: oxidative mechanisms. *Arch Neurol* 59(9):1395-402.
- Haller RG, Vissing J. 2004. No spontaneous second wind in muscle phosphofructokinase deficiency. *Neurology* 62(1):82-6.
- Haller RG, Wyrick P, Taivassalo T, Vissing J. 2006. Aerobic conditioning: an effective therapy in McArdle's disease. *Ann Neurol* 59(6):922-8.
- Hamroff G, Katz SD, Mancini D, Blaufarb I, Bijou R, Patel R, Jondeau G, Olivari MT, Thomas S, Le Jemtel TH. 1999. Addition of angiotensin II receptor blockade to maximal angiotensin-converting enzyme inhibition improves exercise capacity in patients with severe congestive heart failure. *Circulation* 99(8):990-2.
- Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, Lebrasseur NK, Yan Z, Spiegelman BM. 2007. Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *J Biol Chem* 282(41):30014-21.
- Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, Kimura S, Kadowaki T. 2002. A genetic variation in the PGC-1 gene could confer insulin resistance and susceptibility to Type II diabetes. *Diabetologia* 45(5):740-3.
- He Z, Hu Y, Feng L, Bao D, Wang L, Li Y, Wang J, Liu G, Xi Y, Wen L and others. 2008. Is there an association between PPARGC1A genotypes and endurance capacity in Chinese men? *Scand J Med Sci Sports* 18(2):195-204.
- Heller SL, Kaiser KK, Planer GJ, Hagberg JM, Brooke MH. 1987. McArdle's disease with myoadenylate deaminase deficiency: observations in a combined enzyme deficiency. *Neurology* 37(6):1039-42.
- Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR, Youngblood EB, Schmit MB, Dietze GJ. 1999. ACE inhibition and glucose transport in insulinresistant muscle: roles of bradykinin and nitric oxide. *Am J Physiol* 277(1 Pt 2):R332-6.
- Hirawat S, Welch EM, Elfring GL, Northcutt VJ, Paushkin S, Hwang S, Leonard EM, Almstead NG, Ju W, Peltz SW and others. 2007. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of

- PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *J Clin Pharmacol* 47(4):430-44.
- Howell JM, Walker KR, Davies L, Dunton E, Everaardt A, Laing N, Karpati G. 2008. Adenovirus and adeno-associated virus-mediated delivery of human myophosphorylase cDNA and LacZ cDNA to muscle in the ovine model of McArdle's disease: expression and re-expression of glycogen phosphorylase. *Neuromuscul Disord* 18(3):248-58.
- Hudson JW, Golding GB, Crerar MM. 1993. Evolution of allosteric control in glycogen phosphorylase. *J Mol Biol* 234(3):700-21.
- Huxley AF, Niedergerke R. 1954. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173(4412):971-3.
- Huxley H, Hanson J. 1954. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 173(4412):973-6.
- Isaacs H, Badenhorst ME, Du Sautoy C. 1989. Myophosphorylase B deficiency and malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 12(3):203-5.
- Isackson PJ, Tarnopolsky M, Vladutiu GD. 2005. A novel mutation in the PYGM gene in a family with pseudo-dominant transmission of McArdle disease. *Mol Genet Metab* 85(3):239-42.
- Ito Y, Saito K, Shishikura K, Suzuki H, Yazaki E, Hayashi K, Fukuda T, Ito M, Sugie H, Osawa M. 2003. A 1-year-old infant with McArdle disease associated with hyper-creatine kinase-emia during febrile episodes. *Brain Dev* 25(6):438-41.
- Iyengar S, Kalinsky H, Weiss S, Korostishevsky M, Sadeh M, Zhao Y, Kidd KK, Bonne-Tamir B. 1997. Homozygosity by descent for a rare mutation in the myophosphorylase gene is associated with variable phenotypes in a Druze family with McArdle disease. *J Med Genet* 34(5):391-4.
- Jeppesen TD, Schwartz M, Olsen DB, Wibrand F, Krag T, Duno M, Hauerslev S, Vissing J. 2006. Aerobic training is safe and improves exercise capacity in patients with mitochondrial myopathy. *Brain* 129(Pt 12):3402-12.
- Kazemi-Esfarjani P, Skomorowska E, Jensen TD, Haller RG, Vissing J. 2002. A nonischemic forearm exercise test for McArdle disease. *Ann Neurol* 52(2):153-9.
- Kem DC, Brown RD. 1990. Renin--from beginning to end. *N Engl J Med* 323(16):1136-7.
- Kinniburgh AJ, Maquat LE, Schedl T, Rachmilewitz E, Ross J. 1982. mRNA-deficient beta o-thalassemia results from a single nucleotide deletion. *Nucleic Acids Res* 10(18):5421-7.
- Kolsch H, Jessen F, Freymann N, Kreis M, Hentschel F, Maier W, Heun R. 2005. ACE I/D polymorphism is a risk factor of Alzheimer's disease but not of vascular dementia. *Neurosci Lett* 377(1):37-9.
- Kubisch C, Wicklein EM, Jentsch TJ. 1998. Molecular diagnosis of McArdle disease: revised genomic structure of the myophosphorylase gene and identification of a novel mutation. *Hum Mutat* 12(1):27-32.
- Laukkanen JA, Kurl S, Salonen JT. 2002. Cardiorespiratory fitness and physical activity as risk predictors of future atherosclerotic cardiovascular diseases. *Curr Atheroscler Rep* 4(6):468-76.
- Layzer RB. 1991. How muscles use fuel. *N Engl J Med* 324(6):411-2.
- Lebo RV, Gorin F, Fletterick RJ, Kao FT, Cheung MC, Bruce BD, Kan YW. 1984. High-resolution chromosome sorting and DNA spot-blot analysis assign McArdle's syndrome to chromosome 11. *Science* 225(4657):57-9.
- Lee CD, Blair SN, Jackson AS. 1999. Cardiorespiratory fitness, body composition, and all-cause and cardiovascular disease mortality in men. *Am J Clin Nutr* 69(3):373-80.
- Leeds P, Peltz SW, Jacobson A, Culbertson MR. 1991. The product of the yeast UPF1 gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev* 5(12A):2303-14.
- Levy MN, Stanton BA, Koeppen BM. 2006. Fisiología. Madrid [etc.]: Elsevier.
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN and others. 2002. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418(6899):797-801.
- Lindner A, Reichert N, Eichhorn M, Zierz S. 2001. Acute compartment syndrome after forearm ischemic work test in a patient with McArdle's disease. *Neurology* 56(12):1779-80.
- Ling C, Poulsen P, Carlsson E, Ridderstrale M, Almgren P, Wojtaszewski J, Beck-Nielsen H, Groop L, Vaag A. 2004. Multiple environmental and genetic factors influence skeletal

- muscle PGC-1alpha and PGC-1beta gene expression in twins. *J Clin Invest* 114(10):1518-26.
- Livingstone C, Al Riyami S, Wilkins P, Ferns GA. 2004. McArdle's disease diagnosed following statin-induced myositis. *Ann Clin Biochem* 41(Pt 4):338-40.
- Lowenstein JM. 1972. Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. *Physiol Rev* 52(2):382-414.
- Lucia A, Gomez-Gallego F, Barroso I, Rabadan M, Bandres F, San Juan AF, Chicharro JL, Ekelund U, Brage S, Earnest CP and others. 2005a. PPARGC1A genotype (Gly482Ser) predicts exceptional endurance capacity in European men. *J Appl Physiol* 99(1):344-8.
- Lucia A, Gomez-Gallego F, Chicharro JL, Hoyos J, Celaya K, Cordova A, Villa G, Alonso JM, Barriopedro M, Perez M and others. 2005b. Is there an association between ACE and CKMM polymorphisms and cycling performance status during 3-week races? *Int J Sports Med* 26(6):442-7.
- Lucia A, Gomez-Gallego F, Santiago C, Bandres F, Earnest C, Rabadan M, Alonso JM, Hoyos J, Cordova A, Villa G and others. 2006. ACTN3 genotype in professional endurance cyclists. *Int J Sports Med* 27(11):880-4.
- Lucia A, Gomez-Gallego F, Santiago C, Perez M, Mate-Munoz JL, Chamorro-Vina C, Nogales-Gadea G, Foster C, Rubio JC, Andreu AL and others. 2007a. The 577X allele of the ACTN3 gene is associated with improved exercise capacity in women with McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 17(8):603-10.
- Lucia A, Mate-Munoz JL, Perez M, Foster C, Gutierrez-Rivas E, Arenas J. 2007b. Double trouble (McArdle's disease and myasthenia gravis): how can exercise help? *Muscle Nerve* 35(1):125-8.
- Lukacs CM, Oikonomakos NG, Crowther RL, Hong LN, Kammlott RU, Levin W, Li S, Liu CM, Lucas-McGady D, Pietranico S and others. 2006. The crystal structure of human muscle glycogen phosphorylase a with bound glucose and AMP: an intermediate conformation with T-state and R-state features. *Proteins* 63(4):1123-6.
- Lynch J, Helmrich SP, Lakka TA, Kaplan GA, Cohen RD, Salonen R, Salonen JT. 1996. Moderately intense physical activities and high levels of cardiorespiratory fitness reduce the risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in middle-aged men. *Arch Intern Med* 156(12):1307-14.
- Mahnke-Zizelman DK, Sabina RL. 1992. Cloning of human AMP deaminase isoform E cDNAs. Evidence for a third AMPD gene exhibiting alternatively spliced 5'-exons. *J Biol Chem* 267(29):20866-77.
- Mancuso M, Filosto M, Tsujino S, Lamperti C, Shanske S, Coquet M, Desnuelle C, DiMauro S. 2003. Muscle glycogenosis and mitochondrial hepatopathy in an infant with mutations in both the myophosphorylase and deoxyguanosine kinase genes. *Arch Neurol* 60(10):1445-7.
- Manfredi G, Silvestri G, Servidei S, Ricci E, Mirabella M, Bertini E, Papacci M, Rana M, Tonali P. 1993. Manifesting heterozygotes in McArdle's disease: clinical, morphological and biochemical studies in a family. *J Neurol Sci* 115(1):91-4.
- Mankodi A, Ashizawa T. 2003. Echo of silence: silent mutations, RNA splicing, and neuromuscular diseases. *Neurology* 61(10):1330-1.
- Maquat LE. 2002. Nonsense-mediated mRNA decay. *Curr Biol* 12(6):R196-7.
- Maquat LE. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2):89-99.
- Marchand I, Chorneyko K, Tarnopolsky M, Hamilton S, Shearer J, Potvin J, Graham TE. 2002. Quantification of subcellular glycogen in resting human muscle: granule size, number, and location. *J Appl Physiol* 93(5):1598-607.
- Martin MA, Rubio JC, Buchbinder J, Fernandez-Hojas R, del Hoyo P, Teijeira S, Gamez J, Navarro C, Fernandez JM, Cabello A and others. 2001a. Molecular heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease): a genotype-phenotype correlation study. *Ann Neurol* 50(5):574-81.
- Martin MA, Rubio JC, Campos Y, Ricoy JR, Cabello A, Arenas J. 2000a. A homozygous missense mutation (A659D) in the myophosphorylase gene in a Spanish patient with McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 10(6):447-9.
- Martin MA, Rubio JC, Campos Y, Vilchez J, Cabello A, Arenas J. 2000b. Two homozygous mutations (R193W and 794/795 delAA) in the myophosphorylase gene in a patient with McArdle's disease. *Hum Mutat* 15(3):294.

- Martin MA, Rubio JC, Garcia A, Fernandez MA, Campos Y, Krawczak M, Cooper DN, Arenas J. 2001b. Resolution of a mispaired secondary structure intermediate could account for a novel micro-insertion/deletion (387 insA/del 8 bp) in the PYGM gene causing McArdle's disease. *Clin Genet* 59(1):48-51.
- Martin MA, Rubio JC, Wevers RA, Van Engelen BG, Steenbergen GC, Van Diggelen OP, De Visser M, De Die-Smulders C, Blazquez A, Andreu AL and others. 2004. Molecular analysis of myophosphorylase deficiency in Dutch patients with McArdle's disease. *Ann Hum Genet* 68(Pt 1):17-22.
- Martinuzzi A, Liava A, Trevisi E, Frare M, Tonon C, Malucelli E, Mannes D, Kemp GJ, Testa C, Barbiroli B and others. 2008. Randomized, placebo-controlled, double-blind pilot trial of ramipril in McArdle's disease. *Muscle Nerve* 37(3):350-7.
- Martinuzzi A, Sartori E, Fanin M, Nascimbeni A, Valente L, Angelini C, Siciliano G, Mongini T, Tonin P, Tomelleri G and others. 2003. Phenotype modulators in myophosphorylase deficiency. *Ann Neurol* 53(4):497-502.
- Martinuzzi A, Schievano G, Nascimbeni A, Fanin M. 1999. McArdle's disease. The unsolved mystery of the reappearing enzyme. *Am J Pathol* 154(6):1893-7.
- Martinuzzi A, Tsujino S, Vergani L, Schievano G, Cadaldini M, Bartoloni L, Fanin M, Siciliano G, Shanske S, DiMauro S and others. 1996. Molecular characterization of myophosphorylase deficiency in a group of patients from northern Italy. *J Neurol Sci* 137(1):14-9.
- Martinuzzi A, Vergani L, Carrozzo R, Fanin M, Bartoloni L, Angelini C, Askanas V, Engel WK. 1993. Expression of muscle-type phosphorylase in innervated and aneural cultured muscle of patients with myophosphorylase deficiency. *J Clin Invest* 92(4):1774-80.
- Mate-Munoz JL, Moran M, Perez M, Chamorro-Vina C, Gomez-Gallego F, Santiago C, Chicharro L, Foster C, Nogales-Gadea G, Rubio JC and others. 2007. Favorable responses to acute and chronic exercise in McArdle patients. *Clin J Sport Med* 17(4):297-303.
- Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG, González de Buitrago JM. 2004. *Bioquímica*. Madrid [etc.]: Pearson.
- McArdle B. 1951. Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown. *Clin. Sci* 10:13-33.
- McConchie SM, Coakley J, Edwards RH, Beynon RJ. 1990. Molecular heterogeneity in McArdle's disease. *Biochim Biophys Acta* 1096(1):26-32.
- Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP, Spiegelman BM. 2001. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7):3820-5.
- Milstein JM, Herron TM, Haas JE. 1989. Fatal infantile muscle phosphorylase deficiency. *J Child Neurol* 4(3):186-8.
- Miranda AF, Nette EG, Hartlage PL, DiMauro S. 1979. Phosphorylase isoenzymes in normal and myophosphorylase-deficient human heart. *Neurology* 29(11):1538-41.
- Mitsumoto H. 1979. McArdle disease: phosphorylase activity in regenerating muscle fibers. *Neurology* 29(2):258-62.
- Mittal SK, Dash SC, Mittal R, Issacs R, Dinda A, Agarwal SK, Saxena S, Tiwari SC. 1995. McArdle's disease presenting as acute renal failure. *Nephron* 71(1):109.
- Mommaerts WF, Illingworth B, Pearson CM, Guillory RJ, Seraydarian K. 1959. A Functional Disorder of Muscle Associated with the Absence of Phosphorylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 45(6):791-7.
- Montfort M, Chabas A, Vilageliu L, Grinberg D. 2006. Analysis of nonsense-mediated mRNA decay in mutant alleles identified in Spanish Gaucher disease patients. *Blood Cells Mol Dis* 36(1):46-52.
- Morisaki H, Morisaki T, Newby LK, Holmes EW. 1993. Alternative splicing: a mechanism for phenotypic rescue of a common inherited defect. *J Clin Invest* 91(5):2275-80.
- Morisaki T, Gross M, Morisaki H, Pongratz D, Zollner N, Holmes EW. 1992. Molecular basis of AMP deaminase deficiency in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(14):6457-61.
- Muller YL, Bogardus C, Pedersen O, Baier L. 2003. A Gly482Ser missense mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 is associated with altered lipid oxidation and early insulin secretion in Pima Indians. *Diabetes* 52(3):895-8.

- Myerson S, Hemingway H, Budget R, Martin J, Humphries S, Montgomery H. 1999. Human angiotensin I-converting enzyme gene and endurance performance. *J Appl Physiol* 87(4):1313-6.
- Nagy E, Maquat LE. 1998. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* 23(6):198-9.
- Newton RU, Galvao DA. 2008. Exercise in Prevention and Management of Cancer. *Curr Treat Options Oncol*.
- Nielsen JN, Vissing J, Wojtaszewski JF, Haller RG, Begum N, Richter EA. 2002. Decreased insulin action in skeletal muscle from patients with McArdle's disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(6):E1267-75.
- Niemi AK, Majamaa K. 2005. Mitochondrial DNA and ACTN3 genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes. *Eur J Hum Genet* 13(8):965-9.
- Nogales-Gadea G, Arenas J, Andreu AL. 2007. Molecular genetics of McArdle's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7(1):84-92.
- Nogales-Gadea G, Rubio JC, Fernandez-Cadenas I, Garcia-Consuegra I, Lucia A, Cabello A, Garcia-Arumi E, Arenas J, Andreu AL, Martin MA. 2008. Expression of the muscle glycogen phosphorylase gene in patients with McArdle disease: the role of nonsense-mediated mRNA decay. *Hum Mutat* 29(2):277-83.
- Norman B, Glenmark B, Jansson E. 1995. Muscle AMP deaminase deficiency in 2% of a healthy population. *Muscle Nerve* 18(2):239-41.
- North KN, Yang N, Wattanasirichaigoon D, Mills M, Eastel S, Beggs AH. 1999. A common nonsense mutation results in alpha-actinin-3 deficiency in the general population. *Nat Genet* 21(4):353-4.
- O'Dochartaigh CS, Ong HY, Lovell SM, Riley MS, Patterson VH, Young IS, Nicholls DP. 2004. Oxygen consumption is increased relative to work rate in patients with McArdle's disease. *Eur J Clin Invest* 34(11):731-7.
- Ollivier K, Hogrel JY, Gomez-Merino D, Romero NB, Laforet P, Eymard B, Portero P. 2005. Exercise tolerance and daily life in McArdle's disease. *Muscle Nerve* 31(5):637-41.
- Onder G, Penninx BW, Balkrishnan R, Fried LP, Chaves PH, Williamson J, Carter C, Di Bari M, Guralnik JM, Pahor M. 2002. Relation between use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and muscle strength and physical function in older women: an observational study. *Lancet* 359(9310):926-30.
- Ozen H. 2007. Glycogen storage diseases: new perspectives. *World J Gastroenterol* 13(18):2541-53.
- Papadimitriou A, Manta P, Divari R, Karabetsos A, Papadimitriou E, Bresolin N. 1990. McArdle's disease: two clinical expressions in the same pedigree. *J Neurol* 237(4):267-70.
- Paradas C, Fernandez-Cadenas I, Gallardo E, Lliger D, Arenas J, Illa I, Andreu AL. 2005. Variable presentation of the clinical phenotype of McArdle's disease in a kindred harbouring a novel compound genotype in the muscle glycogen phosphorylase gene. *Neurosci Lett* 391(1-2):28-31.
- Pari G, Crerar MM, Nalbantoglu J, Shoubbridge E, Jani A, Tsujino S, Shanske S, DiMauro S, Howell JM, Karpatis G. 1999. Myophosphorylase gene transfer in McArdle's disease myoblasts in vitro. *Neurology* 53(6):1352-4.
- Pearson CM, Rimer DG, Mommaerts WF. 1961. A metabolic myopathy due to absence of muscle phosphorylase. *Am J Med* 30:502-17.
- Perez M, Foster C, Gonzalez-Freire M, Arenas J, Lucia A. 2008. One-year follow-up in a child with McArdle disease: exercise is medicine. *Pediatr Neurol* 38(2):133-6.
- Perez M, Martin MA, Rubio JC, Mate-Munoz JL, Gomez-Gallego F, Foster C, Andreu AL, Arenas J, Lucia A, Fleck SJ. 2006. Exercise capacity in a 78 year old patient with McArdle's disease: it is never too late to start exercising. *Br J Sports Med* 40(8):725-6; discussion 726.
- Perez M, Mate-Munoz JL, Foster C, Rubio JC, Andreu AL, Martin MA, Arenas J, Lucia A. 2007a. Exercise capacity in a child with McArdle disease. *J Child Neurol* 22(7):880-2.
- Perez M, Moran M, Cardona C, Mate-Munoz JL, Rubio JC, Andreu AL, Martin MA, Arenas J, Lucia A. 2007b. Can patients with McArdle's disease run? *Br J Sports Med* 41(1):53-4.
- Perrin-Vidoz L, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Lenoir GM, Mazoyer S. 2002. The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Hum Mol Genet* 11(23):2805-14.

- Phoenix J, Hopkins P, Bartram C, Beynon RJ, Quinlivan RC, Edwards RH. 1998. Effect of vitamin B6 supplementation in McArdle's disease: a strategic case study. *Neuromuscul Disord* 8(3-4):210-2.
- Pinotsis N, Leonidas DD, Chrysina ED, Oikonomakos NG, Mavridis IM. 2003. The binding of beta- and gamma-cyclodextrins to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies. *Protein Sci* 12(9):1914-24.
- Pourmand R, Sanders DB, Corwin HM. 1983. Late-onset McArdle's disease with unusual electromyographic findings. *Arch Neurol* 40(6):374-7.
- Pros E, Larriba S, Lopez E, Ravella A, Gili ML, Kruyer H, Valls J, Serra E, Lazaro C. 2006. NF1 mutation rather than individual genetic variability is the main determinant of the NF1-transcriptional profile of mutations affecting splicing. *Hum Mutat* 27(11):1104-14.
- Puigserver P, Spiegelman BM. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24(1):78-90.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92(6):829-39.
- Purintrapiban J, Wang M, Forsberg NE. 2001. Identification of glycogen phosphorylase and creatine kinase as calpain substrates in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 33(5):531-40.
- Quinlivan R, Beynon RJ. 2004. Pharmacological and nutritional treatment for McArdle's disease (Glycogen Storage Disease type V). *Cochrane Database Syst Rev*(3):CD003458.
- Quinlivan R, Beynon RJ, Martinuzzi A. 2008. Pharmacological and nutritional treatment for McArdle disease (Glycogen Storage Disease type V). *Cochrane Database Syst Rev*(2):CD003458.
- Quintans B, Sanchez-Andrade A, Teijeira S, Fernandez-Hojas R, Rivas E, Lopez MJ, Navarro C. 2004. A new rare mutation (691delCC/insAAA) in exon 17 of the PYGM gene causing McArdle disease. *Arch Neurol* 61(7):1108-10.
- Raggi A, Ranieri-Raggi M. 1987. Regulatory properties of AMP deaminase isoenzymes from rabbit red muscle. *Biochem J* 242(3):875-9.
- Rankinen T, Bray MS, Hagberg JM, Perusse L, Roth SM, Wolfarth B, Bouchard C. 2006. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2005 update. *Med Sci Sports Exerc* 38(11):1863-88.
- Reuschenbach C, Zierz S. 1988. Mutant carnitine palmitoyltransferase associated with myoadenylate deaminase deficiency in skeletal muscle. *J Pediatr* 112(4):600-3.
- Rico-Sanz J, Rankinen T, Joanisse DR, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard C. 2003. Associations between cardiorespiratory responses to exercise and the C34T AMPD1 gene polymorphism in the HERITAGE Family Study. *Physiol Genomics* 14(2):161-6.
- Richards JG, Heigenhauser GJ, Wood CM. 2002. Glycogen phosphorylase and pyruvate dehydrogenase transformation in white muscle of trout during high-intensity exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282(3):R828-36.
- Rieder MJ, Taylor SL, Clark AG, Nickerson DA. 1999. Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme. *Nat Genet* 22(1):59-62.
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434(7029):113-8.
- Rommel O, Kley RA, Dekomien G, Epplen JT, Vorgerd M, Hasenbring M. 2006. Muscle pain in myophosphorylase deficiency (McArdle's disease): the role of gender, genotype, and pain-related coping. *Pain* 124(3):295-304.
- Roubertie A, Patte K, Rivier F, Pages AM, Maire I, Echenne B. 1998. McArdle's disease in childhood: report of a new case. *Eur J Paediatr Neurol* 2(5):269-73.
- Rubio JC, Garcia-Consuegra I, Nogales-Gadea G, Blazquez A, Cabello A, Lucia A, Andreu AL, Arenas J, Martin MA. 2007a. A proposed molecular diagnostic flowchart for myophosphorylase deficiency (McArdle disease) in blood samples from Spanish patients. *Hum Mutat* 28(2):203-4.
- Rubio JC, Gomez-Gallego F, Santiago C, Garcia-Consuegra I, Perez M, Barriopedro MI, Andreu AL, Martin MA, Arenas J, Lucia A. 2007b. Genotype modulators of clinical severity in McArdle disease. *Neurosci Lett* 422(3):217-22.

- Rubio JC, Lucia A, Fernandez-Cadenas I, Cabello A, Blazquez A, Gamez J, Andreu AL, Martin MA, Arenas J. 2006. Novel mutation in the PYGM gene resulting in McArdle disease. *Arch Neurol* 63(12):1782-4.
- Rubio JC, Martin MA, Bautista J, Campos Y, Segura D, Arenas J. 1997. Association of genetically proven deficiencies of myophosphorylase and AMP deaminase: a second case of 'double trouble'. *Neuromuscul Disord* 7(6-7):387-9.
- Rubio JC, Martin MA, Bautista J, Campos Y, Segura D, Cabello A, Chinchon I, Arenas J. 1998. Myophosphorylase deficiency associated with a defect in complex I of the mitochondrial respiratory chain. *J Neurol Sci* 161(2):110-3.
- Rubio JC, Martin MA, Campos Y, Auciello R, Cabello A, Arenas J. 2000a. A missense mutation W797R in the myophosphorylase gene in a Spanish patient with McArdle's disease. *Muscle Nerve* 23(1):129-31.
- Rubio JC, Martin MA, Campos Y, Cabello A, Arenas J. 2000b. A missense mutation T487N in the myophosphorylase gene in a Spanish patient with McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 10(2):138-40.
- Rubio JC, Martin MA, Del Hoyo P, Bautista J, Campos Y, Segura D, Navarro C, Ricoy JR, Cabello A, Arenas J. 2000c. Molecular analysis of Spanish patients with AMP deaminase deficiency. *Muscle Nerve* 23(8):1175-8.
- Rubio JC, Martin MA, Rabadan M, Gomez-Gallego F, San Juan AF, Alonso JM, Chicharro JL, Perez M, Arenas J, Lucia A. 2005. Frequency of the C34T mutation of the AMPD1 gene in world-class endurance athletes: does this mutation impair performance? *J Appl Physiol* 98(6):2108-12.
- Rubio JC, Perez M, Mate-Munoz JL, Garcia-Consuegra I, Chamorro-Vina C, Fernandez del Valle M, Andreu AL, Martin MA, Arenas J, Lucia A. 2008. AMPD1 genotypes and exercise capacity in McArdle patients. *Int J Sports Med* 29(4):331-5.
- Sabina RL, Morisaki T, Clarke P, Eddy R, Shows TB, Morton CC, Holmes EW. 1990. Characterization of the human and rat myoadenylate deaminase genes. *J Biol Chem* 265(16):9423-33.
- Sauret JM, Marinides G, Wang GK. 2002. Rhabdomyolysis. *Am Fam Physician* 65(5):907-12.
- Schmid R, Mahler R. 1959. Chronic progressive myopathy with myoglobinuria: demonstration of a glycogenolytic defect in the muscle. *J Clin Invest* 38:2044-58.
- Schroers A, Kley RA, Stachon A, Horvath R, Lochmuller H, Zange J, Vorgerd M. 2006. Gentamicin treatment in McArdle disease: failure to correct myophosphorylase deficiency. *Neurology* 66(2):285-6.
- Servidei S, Shanske S, Zeviani M, Lebo R, DiMauro S. 1988. McArdle's disease: biochemical and molecular genetic studies. *Ann Neurol* 24(6):774-81.
- Siciliano G, Rossi B, Martini A, Angelini C, Martinuzzi A, Lodi R, Zaniol P, Barbiroli B, Murtorio A. 1995. Myophosphorylase deficiency affects muscle mitochondrial respiration as shown by ³¹P-MR spectroscopy in a case with associated multifocal encephalopathy. *J Neurol Sci* 128(1):84-91.
- Slonim AE, Goans PJ. 1985. Myopathy in McArdle's syndrome. Improvement with a high-protein diet. *N Engl J Med* 312(6):355-9.
- Sohn EH, Kim HS, Lee AY, Fukuda T, Sugie H, Kim DS. 2008. A novel PYGM mutation in a Korean patient with McArdle disease: The role of nonsense-mediated mRNA decay. *Neuromuscul Disord*.
- Sonna LA, Sharp MA, Knapik JJ, Cullivan M, Angel KC, Patton JF, Lilly CM. 2001. Angiotensin-converting enzyme genotype and physical performance during US Army basic training. *J Appl Physiol* 91(3):1355-63.
- Stefan N, Thamer C, Staiger H, Machicao F, Machann J, Schick F, Venter C, Niess A, Laakso M, Fritsche A and others. 2007. Genetic variations in PPARG and PPARGC1A determine mitochondrial function and change in aerobic physical fitness and insulin sensitivity during lifestyle intervention. *J Clin Endocrinol Metab* 92(5):1827-33.
- Sugie H, Sugie Y, Ito M, Fukuda T, Nonaka I, Igarashi Y. 1995. Genetic analysis of Japanese patients with myophosphorylase deficiency (McArdle's disease): single-codon deletion in exon 17 is the predominant mutation. *Clin Chim Acta* 236(1):81-6.
- Tabata T, Kikunami K, Matsushita Y, Inoue T, Inoue T, Okamoto T, Kono N, Takahashi M, Tarui S, Morii H. 1986. Acute renal failure in McArdle's disease. *Nephron* 44(4):371-4.
- Takeuchi T, Kuriaki H. 1955. Histochemical detection of phosphorylase in animal tissues. *J Histochem Cytochem* 3(3):153-60.

- Tan P, Allen JG, Wilton SD, Akkari PA, Huxtable CR, Laing NG. 1997. A splice-site mutation causing ovine McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 7(5):336-42.
- Tarnopolsky MA, Parise G, Gibala MJ, Graham TE, Rush JW. 2001. Myoadenylate deaminase deficiency does not affect muscle anaplerosis during exhaustive exercise in humans. *J Physiol* 533(Pt 3):881-9.
- Tarui S, Okuno G, Ikura Y, Tanaka T, Suda M, Nishikawa M. 1965. Phosphofructokinase Deficiency in Skeletal Muscle. a New Type of Glycogenosis. *Biochem Biophys Res Commun* 19:517-23.
- Tein I. 1996. Metabolic myopathies. *Semin Pediatr Neurol* 3(2):59-98.
- Terada S, Tabata I. 2004. Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1 α protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(2):E208-16.
- Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F. 1992. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 51(1):197-205.
- Tsujino S, Shanske S, Carroll JE, Sabina RL, DiMauro S. 1995a. Double trouble: combined myophosphorylase and AMP deaminase deficiency in a child homozygous for nonsense mutations at both loci. *Neuromuscul Disord* 5(4):263-6.
- Tsujino S, Shanske S, DiMauro S. 1993. Molecular genetic heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *N Engl J Med* 329(4):241-5.
- Tsujino S, Shanske S, Goto Y, Nonaka I, DiMauro S. 1994a. Two mutations, one novel and one frequently observed, in Japanese patients with McArdle's disease. *Hum Mol Genet* 3(6):1005-6.
- Tsujino S, Shanske S, Nonaka I, DiMauro S. 1995b. The molecular genetic basis of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *Muscle Nerve* 3:S23-7.
- Tsujino S, Shanske S, Nonaka I, Eto Y, Mendell JR, Fenichel GM, DiMauro S. 1994b. Three new mutations in patients with myophosphorylase deficiency (McArdle disease). *Am J Hum Genet* 54(1):44-52.
- Tsujino S, Shanske S, Valberg SJ, Cardinet GH, 3rd, Smith BP, DiMauro S. 1996. Cloning of bovine muscle glycogen phosphorylase cDNA and identification of a mutation in cattle with myophosphorylase deficiency, an animal model for McArdle's disease. *Neuromuscul Disord* 6(1):19-26.
- Tsushima K, Koyama S, Ueno M, Fujimoto K, Ichiyoshi T, Takei Y, Hanyu N, Kubo K. 2001. Rhabdomyolysis triggered by an asthmatic attack in a patient with McArdle disease. *Intern Med* 40(2):131-4.
- Tunstall RJ, Mehan KA, Wadley GD, Collier GR, Bonen A, Hargreaves M, Cameron-Smith D. 2002. Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(1):E66-72.
- Valentine CR. 1998. The association of nonsense codons with exon skipping. *Mutat Res* 411(2):87-117.
- Vandenbergh K, Goris M, Van Hecke P, Van Leemputte M, Vangerven L, Hespel P. 1997. Long-term creatine intake is beneficial to muscle performance during resistance training. *J Appl Physiol* 83(6):2055-63.
- Verzijl HT, van Engelen BG, Luyten JA, Steenbergen GC, van den Heuvel LP, ter Laak HJ, Padberg GW, Wevers RA. 1998. Genetic characteristics of myoadenylate deaminase deficiency. *Ann Neurol* 44(1):140-3.
- Vieitez I, Teijeira S, Miranda S, San Millan B, Navarro C. 2008. Gene symbol: PYGM. Disease: McArdle disease. *Hum Genet* 123(1):114.
- Vincent B, De Bock K, Ramaekers M, Van den Eede E, Van Leemputte M, Hespel P, Thomis MA. 2007. ACTN3 (R577X) genotype is associated with fiber type distribution. *Physiol Genomics* 32(1):58-63.
- Vissing J, Haller RG. 2003a. A diagnostic cycle test for McArdle's disease. *Ann Neurol* 54(4):539-42.
- Vissing J, Haller RG. 2003b. The effect of oral sucrose on exercise tolerance in patients with McArdle's disease. *N Engl J Med* 349(26):2503-9.
- Voduc N, Webb KA, D'Arsigny C, McBride I, O'Donnell DE. 2004. McArdle's disease presenting as unexplained dyspnea in a young woman. *Can Respir J* 11(2):163-7.

- Vorgerd M, Kubisch C, Burwinkel B, Reichmann H, Mortier W, Tettenborn B, Pongratz D, Lindemuth R, Tegenthoff M, Malin JP and others. 1998. Mutation analysis in myophosphorylase deficiency (McArdle's disease). *Ann Neurol* 43(3):326-31.
- Vorgerd M, Zange J. 2002. Carbohydrate oxidation disorders of skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5(6):611-7.
- Vorgerd M, Zange J, Kley R, Grehl T, Husing A, Jager M, Muller K, Schroder R, Mortier W, Fabian K and others. 2002. Effect of high-dose creatine therapy on symptoms of exercise intolerance in McArdle disease: double-blind, placebo-controlled crossover study. *Arch Neurol* 59(1):97-101.
- Wagner KR, Hamed S, Hadley DW, Gropman AL, Burstein AH, Escolar DM, Hoffman EP, Fischbeck KH. 2001. Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol* 49(6):706-11.
- Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM. 2003. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113(2):159-70.
- Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, Ham J, Kang H, Evans RM. 2004. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol* 2(10):e294.
- Wei M, Gibbons LW, Mitchell TL, Kampert JB, Lee CD, Blair SN. 1999. The association between cardiorespiratory fitness and impaired fasting glucose and type 2 diabetes mellitus in men. *Ann Intern Med* 130(2):89-96.
- Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S and others. 2007. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447(7140):87-91.
- Wende AR, Huss JM, Schaeffer PJ, Giguere V, Kelly DP. 2005. PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 25(24):10684-94.
- Wende AR, Schaeffer PJ, Parker GJ, Zechner C, Han DH, Chen MM, Hancock CR, Lehman JJ, Huss JM, McClain DA and others. 2007. A role for the transcriptional coactivator PGC-1alpha in muscle refueling. *J Biol Chem* 282(50):36642-51.
- Westerblad H, Allen DG, Lannergren J. 2002. Muscle fatigue: lactic acid or inorganic phosphate the major cause? *News Physiol Sci* 17:17-21.
- Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, Aviram M, Bdolah-Abram T, Bebock Z, Shushi L and others. 2003. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med* 349(15):1433-41.
- Wolfe GI, Baker NS, Haller RG, Burns DK, Barohn RJ. 2000. McArdle's disease presenting with asymmetric, late-onset arm weakness. *Muscle Nerve* 23(4):641-5.
- Yang N, MacArthur DG, Gulbin JP, Hahn AG, Beggs AH, Easteal S, North K. 2003. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. *Am J Hum Genet* 73(3):627-31.
- Zange J, Grehl T, Disselhorst-Klug C, Rau G, Muller K, Schroder R, Tegenthoff M, Malin JP, Vorgerd M. 2003. Breakdown of adenine nucleotide pool in fatiguing skeletal muscle in McArdle's disease: a noninvasive ³¹P-MRS and EMG study. *Muscle Nerve* 27(6):728-36.
- Zhang J, Maquat LE. 1997. Evidence that translation reinitiation abrogates nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Embo J* 16(4):826-33.